

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2 ET  
ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE INDUITE PAR LES CYSTÉINYL-  
LEUCOTRIÈNES DANS L'ASTHME**

par

**CHARLES THOMPSON**

Département de pédiatrie  
Service d'immunologie

Thèse présentée à la faculté de médecine  
en vue de l'obtention du grade de  
*Philosophiae Doctor* (PhD) en Immunologie

Décembre 2006



Library and  
Archives Canada

Bibliothèque et  
Archives Canada

Published Heritage  
Branch

Direction du  
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file    Votre référence*

*ISBN: 978-0-494-25927-6*

*Our file    Notre référence*

*ISBN: 978-0-494-25927-6*

#### NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

#### AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

---

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.

  
**Canada**

## TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	I
LISTE DES FIGURES.....	IV
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
RÉSUMÉ.....	X

### INTRODUCTION :

#### 1. L'ASTHME

1.1 La maladie asthmatique.....	1
1.2 Phase précoce (aiguë).....	2
1.3 Phase tardive (inflammation pulmonaire).....	4
1.4 Remodelage pulmonaire.....	5
1.5 Asthme sévère.....	10
1.6 MPOC (maladie pulmonaire obstructive chronique).....	10
1.7 Traitements.....	11

#### 2. LES CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES

2.1 Biosynthèse.....	12
2.2 Les récepteurs CysLT.....	14
2.2.1 CysLT1.....	15
2.2.2 CysLT2.....	16
2.3 Effets biologiques des cystéinyl-leucotriènes.....	17
2.4 Antagonistes.....	20

3. SIGNALISATION	
3.1 Signalisation des RCPG.....	22
3.2 NF- $\kappa$ B.....	23
3.3 AP-1.....	24
3.4 PKC.....	25
3.5 GATA.....	26
4. SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS CYSLT	
4.1 CysLT1.....	27
4.2 CysLT2.....	29
5. LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE.....	30

## RÉSULTATS :

Chapitre I :	Introduction	
	LES CHIMIOKINES.....	32
	<u>Charles Thompson</u> , Alexandre Cloutier , Ynuk Bossé, Maryse Thivierge, Christian Le Gouill, Pierre Larivée, Patrick P. McDonald, Jana Stankova, Marek Rola- Pleszczynski <b>CysLT1 Receptor Engagement Induces AP-1- and NF-<math>\kappa</math>B-Dependent Interleukin-8 Expression</b> <i>Am J Respir Cell Mol Biol</i> 2006 Jun 29 (sous presse) .....	38
Chapitre II :	<u>Charles Thompson</u> , Alexandre Cloutier , Ynuk Bossé, Caroline Poisson, Pierre Larivée, Patrick P. McDonald, Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski <b>Signaling by the Cysteinyl-Leukotriene Receptor 2 : Involvement in Chemokine Gene Transcription</b> <i>Journal of Biochemical Chemistry</i> (soumis en août 2006).....	72



Chapitre III : Introduction :	
LA FURINE.....	111
Charles Thompson , Stéphanie McMahon, Ynuk Bossé, Claire Dubois, Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski <b>Leukotriene D<sub>4</sub> Upregulates Furin Expression Through            CysLT1 Receptor Signaling: Potential Implications in            Airway Remodeling</b> <i>Journal of Immunology</i> (soumis en août 2006).....	
	119
<u>DISCUSSION</u> .....	152
<u>CONCLUSION</u> .....	183
<u>REMERCIEMENTS</u> .....	184
<u>BIBLIOGRAPHIE</u> .....	185

## **LISTE DES FIGURES**

### **INTRODUCTION :**

Figure 1 : Biosynthèse de leucotriènes.....	13
Figure 2 : Illustration de la maturation et de l'activation du pro-TGF $\beta$ 1.....	114
Figure 3 : Représentation schématique de la région en 5' du gène de la furine.....	116

### **CHAPITRE I :**

Figure 1 : Induction of IL-8 gene expression by LTD <sub>4</sub> in THP-1 cells and human dendritic cells.....	58
Figure 2 : LTD <sub>4</sub> induces a concentration- and time-dependent IL-8 synthesis in 293LT1 cells.....	59
Figure 3 : Implication of NF- $\kappa$ B and AP-1 binding sites in IL-8 promoter activity stimulated by LTD <sub>4</sub> .....	60
Figure 4 : Role of NF- $\kappa$ B pathway in the induction of IL-8 promoter activity by LTD <sub>4</sub> .....	61
Figure 5 : Effect of LTD <sub>4</sub> on the activation of nuclear NF- $\kappa$ B DNA binding activities .....	62
Figure 6 : LTD <sub>4</sub> up-regulates c-fos and c-jun mRNA expression.....	63
Figure 7 : Analysis of AP-1 binding following LTD <sub>4</sub> stimulation.....	64

### **CHAPITRE II**

Figure 1 : LTC <sub>4</sub> induces a time-dependent IL-8 and MCP-1 synthesis in 293LT2 Cells.....	96
Figure 2 : CysLTs increase IL-8 promoter activity : Implication of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL-6 binding sites.....	97
Figure 3 : Role of the NF- $\kappa$ B pathway in the induction of IL-8 promoter activity by LTC <sub>4</sub> .....	98
Figure 4 : Analysis of NF- $\kappa$ B binding following LTC <sub>4</sub> stimulation.....	99

Figure 5 : LTC <sub>4</sub> up-regulates AP-1 DNA binding activities.....	100
Figure 6 : JNK is not involved in LTC <sub>4</sub> -induced c-Jun phosphorylation.....	101
Figure 7 : PKC regulates LTC <sub>4</sub> -induced IL-8 transactivation.....	102
Figure 8 : PKC $\delta$ is involved in LTC <sub>4</sub> -induced activation of the AP-1 pathway.....	103
Figure 9 : LTC <sub>4</sub> -induced NF- $\kappa$ B pathway is abrogated by PKC inhibitors.....	104
Figure 10 : LTC <sub>4</sub> induces a time-dependent expression of IL-8 mRNA in HUVEC.....	105
Figure 11 : Schematic representation of CysLT2 signaling mechanisms involved in LTC <sub>4</sub> -induced chemokine production.....	106

### CHAPITRE III

Figure 1 : LTD <sub>4</sub> induces furin expression at both mRNA and protein levels.....	137
Figure 2 : Analysis of <i>fur</i> promoter activity in response to LTD <sub>4</sub> .....	138
Figure 3 : LTD <sub>4</sub> up-regulates AP-1 DNA binding to <i>fur</i> P1 promoter.....	139
Figure 4 : Implication of AP-1 binding site in <i>fur</i> P1- <i>KpnI</i> promoter transactivation by LTD <sub>4</sub> .....	140
Figure 5 : LTD <sub>4</sub> up-regulates GATA DNA binding to <i>fur</i> P1 promoter.....	141
Figure 6 : Biological impact of LTD <sub>4</sub> -induced furin gene expression.....	142
Figure 7 : Induction of furin gene expression by LTD <sub>4</sub> in monocytic THP-1 cells.....	143
Figure 8 : Proposed impact of cysLT-induced furin expression on airway Remodeling.....	144

### DISCUSSION :

Figure 4 : Schéma des mécanismes de signalisation du récepteur CysLT1 en réponse au LTD <sub>4</sub> , qui engendre la production de chimiokines.....	166
---	-----

Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de signalisation du récepteur CysLT2 en réponse au LTC<sub>4</sub> menant à la production de chimiokine.....167

Figure 6 : Impacts potentiels de l'augmentation de l'expression de la furine par les cysLT sur le remodelage pulmonaire.....177

## LISTES DES ABRÉVIATIONS

5-LO	5-lipoxygénase
ADN	acide désoxyribonucléique
AMPc	adénosine monophosphate cyclique
AP-1	<i>activator protein 1</i>
ARNm	acide ribonucléique messenger
BLT1	récepteur de haute affinité pour le LTB <sub>4</sub>
BSMC	cellule musculaire lisse bronchique
C/EBP	CCAAT-enhancer binding protein
CKII	<i>casein-kinase II</i>
CRE	<i>cAMP-response element</i>
CREB	<i>cAMP responsive element binding protein</i>
cysLT	cystényle-leucotriène
CysLT1	récepteur à cystényle-leucotriènes 1
CysLT2	récepteur à cystényle-leucotriènes 2
DAG	diacylglycérol
DMSO	diméthylsulfoxyde
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERK	<i>extracellular signal-regulated kinase</i>
FcεRI	récepteur de haute affinité pour IgE
FGF-2	<i>fibroblast growth factor 2</i>
FLAP	<i>5-LO-activating protein</i>
<i>fur</i>	<i>fes/fps upstream region</i>
GDP	<i>guanine diphosphate</i>
GSK3	<i>glycogene-synthase-kinase-3β</i>
GTP	<i>guanine triphosphate</i>
HEK293	<i>human embryonic kidney cell 293</i>
HUVEC	cellule endothéliale dérivée de cordon ombélical
Ig	immunoglobuline

IgE	immunoglobuline E
IGF	<i>insulin-like growth factor</i>
IGFBP	<i>insulin-like growth factor binding protein</i>
IgG1	immunoglobuline G1
IFN $\gamma$	interferon $\gamma$
IL-4	interleukine-4
IL-13	interleukine-13
ISRE	<i>interferon-stimulated response element</i>
JNK	<i>Jun N-terminal kinase</i>
kDa	kilo Dalton
LT	leucotriène
LTA	antagoniste des leucotriènes
LTA <sub>4</sub>	leucotriène A <sub>4</sub>
LTB <sub>4</sub>	leucotriène B <sub>4</sub>
LTC <sub>4</sub>	leucotriène C <sub>4</sub>
LTD <sub>4</sub>	leucotriène D <sub>4</sub>
LTE <sub>4</sub>	leucotriène E <sub>4</sub>
MAPKinase	<i>mitogen activated protein kinase</i>
MCP-1	<i>macrophage inflammatory protein 1</i>
MEC	matrice extracellulaire
MEF	<i>myocyte-enhancer factor</i>
MMP	métalloprotéinase de la matrice
MPOC	maladie pulmonaire obstructive chronique
NF- $\kappa$ B	facteur nucléaire $\kappa$ B
NRE	<i>negative regulatory element</i>
NRF	<i>NK-<math>\kappa</math>B repressing factor</i>
p300/CBP	<i>p300/CREB binding protein</i>
PAF	facteur activateur de plaquettes
PC	convertase de proprotéines
PDGF	<i>platelet-derived growth factor</i>
PK1	<i>phosphoinositide-dependent protein kinase 1</i>

PG	prostaglandine
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase
PKC	protéine kinase C
PLC	phospholipase C
PTX	toxine pertussique
PY2	purinorécepteur Y2
RANTES	<i>Regulated on Activation Normal T Cell Expressed and Secreted</i>
RCPG	récepteur couplé aux protéines G
RSK2	<i>ribosomal S6 kinase 2</i>
Smad	<i>similar to mothers against decapentaplegic</i>
SRE	<i>serum response element</i>
SRS-A	<i>slow reacting substance of anaphylaxis</i>
STAT5	<i>signal transducer of activated transcription 5</i>
STAT6	<i>signal transducer of activated transcription 6</i>
TGF- $\beta$	<i>transforming growth factor beta</i>
TIMP	<i>tissue inhibitor of matrix metalloproteinase</i>
TNF- $\alpha$	<i>tumor necrosis factor alpha</i>
TPA	<i>12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate</i>
TRE	<i>12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)-responsive element</i>
VEGF	<i>vascular endothelial growth factor</i>

UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

**SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2 ET  
ACTIVATION TRANSCRIPTIONNELLE INDUITE PAR LES  
CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES DANS L'ASTHME**

Par

**Charles Thompson**

Programme d'immunologie

Thèse présentée à la faculté de Médecine  
En vue de l'obtention du grade de  
*Philosophiae Doctor* (Ph.D.) en Immunologie

**RÉSUMÉ**

Depuis quelques années, une population croissante d'enfants et d'adultes est touchée par l'asthme. L'étendue des recherches sur le sujet reflète sans doute la complexité de cette maladie. En effet, la pathogénèse de l'asthme est sous le contrôle de plusieurs médiateurs, générés par une multitude de cellules (inflammatoires et structurelles) qui s'organisent et interagissent entre elles. L'aspect multifactoriel et hétérogène de cette pathologie en font une cible difficile à atteindre. Parmi ses principales caractéristiques, on retrouve le bronchospasme, l'hypersécrétion de mucus, l'hyper-réactivité bronchique, l'inflammation et le remodelage pulmonaire.

À la fin des années 1990, les antagonistes classiques des leucotriènes font leur apparition sur le marché et sont prescrits pour le traitement de l'asthme. Il s'agit d'antagonistes spécifiques du récepteur CysLT1, le premier de deux récepteurs de hautes affinités pour les cystéinyl-leucotriènes (cysLT). Les cysLT sont des médiateurs lipidiques impliqués dans plusieurs processus inflammatoires. En plus d'être augmentés dans l'asthme, ils ont la capacité de mimer les principaux symptômes asthmatiques.



Malgré l'utilisation clinique des antagonistes classiques des leucotriènes, plusieurs mécanismes moléculaires et cellulaires des cysLT demeurent inconnus.

Dans la présente thèse, nous avons initialement abordé le rôle des cysLT dans le processus inflammatoire impliqué dans les cas plus sévères d'asthme. Nous avons par conséquent étudié la capacité des cysLT à induire la production d'une chimiokine. L'asthme sévère étant caractérisé par un influx neutrophilique, nous nous sommes principalement concentré sur l'expression de l'IL-8, le chimioattractant par excellence de ce type cellulaire. Nous avons observé une très forte induction de l'IL-8 en réponse aux cysLT et ce, par l'intermédiaire du récepteur CysLT1 et CysLT2. Un des objectifs principaux de ce travail était l'étude de la signalisation induite par les récepteurs CysLT1 et CysLT2. Les deux récepteurs répondant aux mêmes agonistes, nous avons par conséquent généré deux modèles cellulaires, afin d'étudier chacun spécifiquement. Le premier modèle exprime de façon stable le CysLT1, alors que le second exprime le CysLT2. Nous avons donc mis en lumière les mécanismes de régulation transcriptionnelle impliqués dans l'expression de l'IL-8 par les cysLT. Les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et AP-1 sont fortement impliquées dans la transduction de signal de chaque récepteur CysLT. Nous avons donc approfondi l'étude de ces voies de signalisation en réponse au cysLT.

Des études récentes proposent un rôle pour les cysLT dans le remodelage pulmonaire. Les changements structuraux des voies aériennes impliquent la participation de plusieurs molécules fibrogéniques et angiogéniques. Parmi ces facteurs, plusieurs sont synthétisés sous forme de précurseur qui nécessite une activation/maturation par clivage endoprotéolytique. Cette tâche peut être accomplie par la furine, une convertase de proprotéine. Ainsi, nous avons étudié l'effet des cysLT sur l'expression de la furine et les mécanismes de régulation concernés. Nous démontrons en fait que le LTD<sub>4</sub>, via le récepteur CysLT1, induit l'expression de la furine, autant au niveau de l'ARNm que la protéine. De plus, l'augmentation de la furine coïncide avec une hausse de l'activation de la métalloprotéinase MT1-MMP et du TGF $\beta$ , deux facteurs impliqués dans le remodelage pulmonaire.

Enfin, cette thèse propose de nouveaux mécanismes par lesquels les cysLT et leurs récepteurs participent à la pathogénèse asthmatique. Ainsi, nous démontrons que les cysLT jouent un rôle dans l'inflammation pulmonaire en stimulant la production de chimiokines. Nous avons également approfondi les connaissances sur les voies de signalisation menant à la production d'IL-8 en réponse au cysLT. Finalement, nous suggérons l'implication des cysLT dans le remodelage pulmonaire via l'induction de la convertase de proprotéine furine.

# INTRODUCTION

## 1. L'ASTHME

### 1.1 La maladie asthmatique

L'asthme est une maladie multifactorielle, caractérisée par une obstruction réversible des voies aériennes, une hyper-réactivité bronchique et de l'inflammation (Lemanske and Busse, 2003). Cette pathologie touche autant les enfants que les adultes ; néanmoins, sa compréhension reste toujours incomplète. Sa prévalence augmente constamment et cette croissance est surtout ressentie dans les pays industrialisés. De nos jours, l'asthme atteint effectivement autour de 10% de la population occidentale. Face à l'incidence croissante de l'asthme durant les dernières décennies, Holgate et ses collaborateurs ont suggéré que les facteurs environnementaux pourraient être la cause de cette propagation (Holgate et al., 2003).

D'un autre côté, plusieurs études épidémiologiques, ainsi qu'un très grand nombre de chercheurs, postulent une contribution génétique majeure à la pathogénèse asthmatique (Cookson, 2002). Sans doute, l'hérédité constitue-t-elle un facteur important de cette maladie. Il faut toutefois garder en mémoire qu'au cours des 30 dernières années, la croissance de l'asthme s'est révélée extrêmement rapide. Ainsi, sans négliger l'hypothèse des changements génétiques, celle-ci explique mal l'essor observé. En effet, les variations géniques nécessitent un laps de temps beaucoup plus long pour se manifester. Les changements environnementaux, quant à eux, pourraient davantage expliquer son augmentation rapide. À l'ère de l'accord de Kyoto, personne n'est sans savoir que la planète se retrouve avec des problèmes de pollution importants, qui vont au-delà des changements climatiques, et qui peuvent atteindre la santé humaine.

La compréhension de la pathologie asthmatique passe tout d'abord par son processus d'identification, qui reste encore difficile et déficient. Il existe une très grande hétérogénéité dans les phénotypes d'asthme, hétérogénéité de laquelle nous pouvons ressortir quelques caractéristiques intéressantes. Le type d'asthme est souvent classé selon son facteur déclencheur, ainsi que selon sa sévérité. On retrouve par exemple l'asthme atopique, l'asthme occupationnel, l'asthme induit par le froid et l'asthme induit par l'aspirine. Selon le cas, l'asthme peut être faible, modéré ou sévère. Enfin, ces types asthmatiques impliquent également des mécanismes différents.

Des points de vue cellulaire et moléculaire, l'asthme peut être séparé en deux phases. Premièrement, la phase précoce (aiguë) survient environ 15-30 minutes après l'exposition à un allergène (ou stimulus non spécifique). Dans un second temps, la phase tardive, qui mène à la chronicité de la maladie, atteint son paroxysme environ 4 à 6 heures après le contact avec l'élément déclencheur et elle implique des processus inflammatoires (Elias et al., 2003a). Les deux prochaines sections seront réservées au survol de ces deux phases de l'asthme.

## **1.2 Phase précoce (aiguë)**

La phase aiguë se caractérise principalement par le bronchospasme, c'est-à-dire le rétrécissement de la lumière bronchique, ainsi que par la surproduction de mucus (Lemanske, 2000). Le phénomène est mieux compris chez les personnes souffrant d'asthme atopique. En quelques mots, l'atopie peut se définir comme une prédisposition à développer une réaction d'hypersensibilité immédiate et ce, à la suite de la reconnaissance d'un antigène (allergène) même en quantité minime (*Larousse médical* 1995). Les sujets allergiques cependant, ne sont pas nécessairement asthmatiques. D'ailleurs, l'atopie atteint environ 30% de la population, alors que l'asthme ne touche que 10% de celle-ci.

Dans un premier temps, mentionnons que la phase précoce est un phénomène orchestré par les lymphocytes Th2, qui produisent les cytokines IL-4 et IL-13 (Ray and Cohn, 1999). Ces cytokines seraient des régulateurs centraux de la maladie. Elles sont aussi responsables de la commutation isotypique des immunoglobulines (Ig) en IgE (Hershey, 2003). Par l'intermédiaire de leurs portions Fc, ces IgE se posent sur leurs récepteurs de haute affinité (FcεRI) qui sont localisés sur les mastocytes et les basophiles (Hamid et al., 2003). À la suite d'une réexposition à l'allergène, celui-ci fait le pont entre deux IgE qui lui sont spécifiques, menant à la dégranulation et à l'activation des mastocytes. À ce moment, les mastocytes relâchent des cytokines préformées (IL-4, IL-5), de l'histamine, de la tryptase et synthétisent des prostaglandines (PG) et des leucotriènes (LT) (Elias et al., 2003b; Hamid et al., 2003). L'histamine, la PGD<sub>2</sub>, le facteur activateur de plaquettes (PAF) et les LT sont en partie responsables de la constriction des muscles lisses bronchiques (Lemanske and Busse). Parallèlement, l'IL-13 et le LTD<sub>4</sub> entraînent la surproduction de mucus qui, avec le rétrécissement bronchique, obstrue davantage les voies aériennes et rend l'expiration difficile (Lewis et al., 1990; Wills-Karp et al., 1998).

D'autre part, l'hyper-réactivité bronchique apparaît comme une des causes de la bronchoconstriction chez les sujets non-atopiques. L'augmentation de la susceptibilité de l'épithélium conduit à la constriction exagérée des muscles lisses bronchiques; tout cela s'effectue en réponse à différents stimuli non spécifiques, tels que la pollution (Peden, 1997), le froid (Latvala et al., 1995), l'exercice (Storms, 2005) ou une infection virale (Caramori et al., 2006; Schaller et al., 2006). Il est à noter que les mécanismes de l'hyper-réactivité bronchique ne sont pas encore très bien connus.

Dans un dernier temps, soulignons que le déclenchement de la phase précoce prépare un environnement propice à la seconde phase, dite phase tardive.

### **1.3 Phase tardive (inflammation pulmonaire)**

En tant que maladie inflammatoire, l'asthme s'articule autour d'un réseau de médiateurs, incluant des cytokines, des chimiokines et des médiateurs lipidiques, tous responsables de l'attraction et de l'activation des cellules inflammatoires (Lemanske and Busse, 2003). L'élément clé de la phase tardive, ou de l'inflammation asthmatique pulmonaire, est le recrutement de leucocytes au site inflammatoire (Metzger et al., 1985). La relâche des médiateurs inflammatoires au niveau pulmonaire peut être réalisée par les leucocytes recrutés au site d'inflammation (Hamid et al., 2003; Hamid and Minshall, 2000), mais les cellules résidentes (ou de structure), comme les cellules musculaires lisses (Howarth et al., 2004; Lazaar and Panettieri, 2001), les cellules épithéliales (Polito and Proud, 1998) ou les cellules endothéliales (Laberge and El Bassam, 2004) peuvent également le faire. C'est ainsi qu'un environnement pro-inflammatoire se crée.

Parmi les cytokines importantes, on retrouve l'interleukine(IL)-4, l'IL-5 et l'IL-13. L'IL-5 participe à l'activation, à la prolifération, à la survie et au recrutement des éosinophiles, qui sont eux-mêmes les constituants majeurs des poumons de patients atteints d'asthme allergique (Lopez et al., 1988; Wardlaw et al., 1995). Les éosinophiles sont fortement responsables des dommages cellulaires dus au relâchement du contenu de leurs granules aux sites inflammatoires. L'IL-4 semble pour sa part détenir un rôle important dans l'initiation de la réaction inflammatoire; sa présence ne s'avère cependant pas obligatoire pour l'implantation d'un phénotype asthmatique (Cohn et al., 1998; Hogan et al., 1998). Du côté de l'IL-13, plusieurs évidences le désignent comme étant un facteur clé dans l'induction des principaux symptômes de l'asthme et de l'allergie. L'IL-13 peut induire de façon indépendante l'hyper-réactivité bronchique, ainsi que l'hyper-sécrétion de mucus (Wills-Karp et al., 1998), en plus de participer au remodelage pulmonaire (Wills-Karp, 2001; Zhu et al., 1999). Nous examinerons les chimiokines (chapitre I, introduction) et les effets biologiques induits des cystéinyl-leucotriènes (section 2.3) ultérieurement.

Soulignons également que l'asthme est une maladie dite de type Th2, car sa pathogénèse implique plusieurs cytokines Th2 dont l'IL-4, l'IL-13 et l'IL-5 (Elias et al., 2003a). La possibilité d'un déséquilibre à l'avantage du phénotype Th2 représente toujours une des hypothèses de la cause asthmatique. La dichotomie Th1/Th2 semble bien établie chez les modèles de souris, mais les preuves se font toujours attendre chez l'humain. En effet, les souris déficientes en IL-5 sont très efficaces pour contrer la maladie (Hamelmann and Gelfand, 1999). Cependant, les traitements d'anti-IL-5 en phase clinique chez l'humain se sont avérés très décevants (Kips et al., 2000; Leckie et al., 2000). De plus, l'expression de l'IFN $\gamma$  est augmentée dans l'asthme (de Blic et al., 2004). Ce même IFN $\gamma$  augmente l'expression du récepteur CysLT1 sur les cellules musculaires lisses bronchiques humaines (Amrani et al., 2001). Nous reviendrons ultérieurement sur le rôle du récepteur CysLT1 dans l'asthme. Le TNF- $\alpha$ , une cytokine « Th1-like », amplifie pour sa part des effets de l'IL-4 et l'IL-13 (Holgate et al., 2003). Bref, une révision s'impose par rapport à la théorie du déséquilibre Th1/Th2 dans l'asthme humain.

Finalement, il faut souligner que le remodelage pulmonaire constitue l'une des phases asthmatiques. Même si sa classification est encore difficile à effectuer, nous en examinerons quelques aspects dans la section qui suit.

#### **1.4 Le remodelage pulmonaire**

La chronicité de l'asthme est fréquemment associée aux changements structuraux. Ceux-ci compteraient parmi les facteurs importants de l'hyper-réactivité bronchique (McParland et al., 2003; Pare et al., 1997) et des pertes de fonctions pulmonaires (Lange et al., 1998; Pascual and Peters, 2005). Les modifications structurales qui surviennent dans la maladie asthmatique chronique sont mieux connues sous l'appellation de remodelage pulmonaire. Le remodelage pulmonaire résulte d'un processus de réparation excessif. Ce dernier dispose de plusieurs caractéristiques telles que : une augmentation du dépôt de protéines de la matrice extracellulaire (MEC) au niveau de la membrane

basale et de la muqueuse bronchique (fibrose sous-épithéliale), la prolifération et l'hypertrophie des muscles lisses bronchiques, l'hyperplasie des cellules à mucus, l'angiogénèse (Lazaar and Panettieri, 2005). Ces phénomènes impliquent plusieurs facteurs fibrogéniques, angiogéniques, des chimiokines et des cytokines, qui activent les cellules mésenchymateuses et la synthèse de protéines de la MEC. Parmi ces facteurs, on retrouve le TGF- $\beta$ , les métalloprotéinases, le FGF-2, le PDGF, le VEGF, l'EGF, l'IGF et leurs récepteurs (Hamid and Minshall, 2000; Parameswaran et al., 2006).

Il est déjà bien établi que le TGF- $\beta$  est augmenté dans l'asthme (Batra et al., 2004; Redington et al., 1997). Le TGF $\beta$  régule la fonction des fibroblastes et des myofibroblastes (Bartram and Speer, 2004), ainsi que la production de plusieurs protéines de la MEC : le collagène (Fine and Goldstein, 1987), la fibronectine (Ignatz and Massague, 1986) et l'élastine (McGowan et al., 1997) en sont des exemples. Le TGF $\beta$  comprend trois isoformes, soit le TGF $\beta$ 1, le TGF $\beta$ 2 et le TGF $\beta$ 3, qui agissent sur la prolifération des fibroblastes. Le TGF $\beta$ 1 demeure la forme la plus étudiée. Ce facteur fibrogénique est produit par différents types cellulaires, comme les macrophages, les éosinophiles, les neutrophiles, les mastocytes, les cellules endothéliales, les cellules épithéliales et les cellules musculaires lisses (Duvernelle et al., 2003). Récemment nous avons démontré que le TGF $\beta$ 1 pouvait agir en synergie avec le FGF-2 pour induire la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques (Bosse et al., 2006). Contrairement au FGF-2, le TGF $\beta$ 1 n'induit pas, à lui seul, la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques (BSMC). Il s'agit plutôt d'un phénomène séquentiel. Le FGF-2, qui se forme rapidement (10 min) à la suite de la rencontre d'un antigène, permet le conditionnement des BSMC. Les cellules sont ensuite mises (24h plus tard) en présence du TGF $\beta$ 1, qui est normalement produit plus tardivement. Le TGF $\beta$ 1 potentialise ainsi la prolifération induite par le FGF-2 (Bosse et al., 2006).

Mentionnons aussi que des niveaux exagérés de VEGF, le « vascular endothelial growth factor », ont été retrouvés chez les patients asthmatiques (Asai et al., 2003; Hoshino et al., 2001a; Kanazawa et al., 2002). Le VEGF est bien reconnu pour ces effets mitogéniques sur les cellules endothéliales (Ferrara, 2004). De plus, à cause de son effet



sur la perméabilité vasculaire, il a été suggéré que le VEGF pourrait contribuer à l'oedème pulmonaire (Charan et al., 1997; Thurston et al., 2000). À cet effet, le remodelage vasculaire et l'angiogénèse représentent des aspects importants de l'asthme, qui s'avèrent toutefois quelque peu négligés. D'ailleurs, nous assistons à un engouement grandissant pour le rôle du VEGF dans la pathogénèse asthmatique. À ce propos, une publication récente dans *Nature Medecine* démontre que le VEGF augmente la sensibilisation respiratoire antigénique, le remodelage vasculaire et l'inflammation chez un modèle asthmatique (Lee et al., 2004a).

Un autre facteur de croissance relié au remodelage est le « Insulin-like growth factor » (IGF-1). Celui-ci semble jouer un rôle dans l'asthme, malgré le fait que son expression ne paraisse pas augmenter dans cette pathologie. La biodisponibilité du IGF-1 est régulée de façon négative par sa liaison aux IGF binding protein (IGFBPs), qui sont elles-mêmes régulées par une protéase (Delafontaine et al., 2004). Ainsi, chez les patients asthmatiques, la MMP1, une protéase de IGFBP est modulée à la hausse, ce qui augmente la biodisponibilité du IGF-1 (Rajah et al.). Plusieurs effets du IGF-1 sur les muscles lisses vasculaires ont déjà été répertoriés, notamment la migration, la modulation phénotypique et la production de MEC (Bayes-Genis et al., 2000; Duan et al., 2000; Hayashi et al., 1999).

Mentionnons également que le « platelet derived growth factor » (PDGF) et le « epidermal growth factor » (EGF) sont de puissants facteurs de croissance qui induisent la prolifération des muscles lisses des voies aériennes (Hamid and Minshall, 2000). Les muscles lisses pulmonaires sont des acteurs fondamentaux dans le maintien du tonus bronchique. Ils ont également la capacité de procéder à l'établissement de l'inflammation par la sécrétion de cytokines et de chimiokines (Howarth et al., 2004; Lazaar and Panettieri, 2001), faisant d'eux des joueurs majeurs dans la pathogénèse de l'asthme.

Les métalloprotéinases (MMP) constituent une famille d'enzymes protéolytiques qui interviennent dans le remodelage de la MEC, ainsi que dans la facilitation de la

migration cellulaire, le clivage de cytokines et l'activation de défensines (Elkington and Friedland, 2006; Nagase and Woessner). Les MMP jouent un rôle essentiel dans la physiologie normale. Cependant, lorsqu'elles sont produites en excès, elles peuvent mener à plusieurs conditions pathologiques. On peut les diviser en différents groupes : collagénases, gélatinases, stromélysines, matrilysines, métalloélastases et, métalloprotéinases de type membranaire (Nagase and Woessner, 1999). Dans les poumons, les cellules musculaires lisses produisent de façon constitutive le MMP-2, MMP-3 et MT1-MMP, cette dernière étant toutefois inactive à cause des fortes concentrations des inhibiteurs TIMP-1 et 2 (Elshaw et al., 2004; Foda et al., 1999). De son côté, la gélatinase MMP-2 peut être maturée par la MT1-MMP et ce, paradoxalement, en présence de TIMP2 (Butler et al., 1998). Le MMP-2 est responsable de la libération de facteurs de croissance (ex : EGF) solubles à partir de leurs précurseurs liés à la membrane (Holgate et al., 2003). La MMP-2 et la MMP-9 participent également à l'activation du TGF $\beta$  (Karsdal et al., 2002; Yu and Stamenkovic, 2000). Ces phénomènes résultent en une prolifération cellulaire, ce qui représente une portion importante du remodelage pulmonaire.

Selon toute vraisemblance, le remodelage pulmonaire pourrait donc contribuer à l'hyper-réactivité bronchique (Pascual and Peters, 2005). En effet, une augmentation de la masse des muscles lisses (épaississement de la paroi des voies aériennes) créerait un rétrécissement de la lumière bronchique. De plus, le remodelage pulmonaire pourrait expliquer l'accélération de la perte des capacités pulmonaires chez les asthmatiques (Pascual and Peters, 2005).

Une attention particulière doit être portée aux changements structuraux, puisqu'ils sont majoritairement irréversibles. Pour cette raison, il est impératif que le remodelage pulmonaire soit prévenu ou traité dès ses débuts. En connaissant ce qui cause les changements structuraux, le traitement pourrait alors s'effectuer à sa source et ainsi prévenir les conséquences malheureuses. Souvenons-nous que les glucocorticoïdes, qui sont les médicaments les plus utilisés pour le traitement de l'asthme, ne constituent pas un remède efficace contre le remodelage pulmonaire. Ils agissent plutôt sur l'aspect

inflammatoire de la pathogénèse asthmatique. En définitive, la panacée appropriée reste toujours à être découverte.

Bien que le remodelage soit présent dans la majorité des phénotypes d'asthme, son importance semble croître selon la gravité de la maladie (Pepe et al., 2005). De ce fait, on rencontre une dominance considérable de ce problème dans les voies aériennes d'individus atteints d'asthme sévère, de la maladie pulmonaire obstructive chronique (MPOC), du syndrome de détresse respiratoire aigu (SDRA) et de la fibrose kystique (Chung, 2005; Lazaar and Panettieri, 2005).

Depuis de nombreuses années, la recherche sur l'asthme est abordée soit pour ses aspects inflammatoires, soit pour ses impacts sur les changements structuraux. Ces deux caractéristiques fondamentales sont souvent étudiées de façon indépendante mais pourtant, elles s'incrivent directement dans l'énigme de l'œuf ou la poule. Certes, il est bien établi que l'asthme fait partie des maladies inflammatoires. D'ailleurs, plusieurs études proposent que la chronicité asthmatique résulte en changements structuraux des voies aériennes (Hamid et al., 2003). Cependant, des modifications structurales au niveau des poumons se retrouvent aussi chez les jeunes enfants asthmatiques (Cokugras et al., 2001), et ce souvent même avant le diagnostic de la maladie (Pohunek et al., 2005). Devant ces constats, il est opportun de se demander si le remodelage pulmonaire est le résultat de l'inflammation ou si, au contraire, ce sont les changements de structures qui installent un environnement propice à l'établissement de l'inflammation. Bien entendu, ces questions demeurent sans réponse. Une meilleure compréhension des événements précurseurs permettrait éventuellement de mieux cibler la problématique et d'établir de meilleures avenues thérapeutiques.

En résumé, l'asthme consiste en une pathologie multifactorielle extrêmement complexe, qui doit être étudiée dans son ensemble. Le bronchospasme, l'hyper-réactivité bronchique, l'inflammation et le remodelage pulmonaire, représentent tous et chacun des éléments constitutifs de la pathologie de l'asthme. Établir les liens et les interconnexions

entre les facteurs, cerner les événements spatio-temporels initiateurs dans l'espoir d'en trouver les séquences, voilà une perspective globale à considérer.

### **1.5 Asthme sévère**

Les mécanismes conduisant au développement de l'asthme sévère sont encore mal connus. L'asthme sévère, aussi dit réfractaire, atteint environ 10% de la population asthmatique (Antonicelli et al., 2004; Barnes and Woolcock, 1998). Il possède des caractéristiques distinctes qui en font une pathologie à part. Il se définit par une inflammation neutrophilique et des changements structuraux, dont l'atteinte pulmonaire est plutôt distale (Busse et al., 2000; Holgate et al., 2006). Malgré la prédominance des neutrophiles, les éosinophiles sont aussi très présents lors des périodes d'exacerbation (Tillie-Leblond et al., 2005). Le traitement demeure un des aspects problématiques de la pathologie, puisque celle-ci ne répond pas à l'arsenal classique de traitement de l'asthme (Busse et al., 2000). La particularité de l'asthme sévère réside dans sa résistance aux corticostéroïdes (Barnes and Woolcock, 1998; Busse et al., 2000), le traitement le plus utilisé pour contrôler l'inflammation dans l'asthme (Peters-Golden and Sampson, 2003). En fait, l'utilisation des traitements classiques peut mener à l'effet inverse, allant jusqu'à aggraver la maladie (Peters-Golden and Sampson, 2003). Les patients souffrant d'asthme sévère ont des symptômes continus, une activité physique limitée, des exacerbations à répétitions et des symptômes nocturnes fréquents (Busse et al., 2000).

### **1.6 MPOC (maladie pulmonaire obstructive chronique)**

Glissons seulement quelques mots sur la MPOC, une maladie souvent méconnue, bien qu'elle ait été la quatrième cause de mortalité aux États-Unis en 2001 (Arias and Smith, 2003). Elle pourrait, en plus, devenir le cinquième plus grand problème de santé publique dans le monde en 2020 (Lopez and Murray, 1998). La MPOC se définit comme un syndrome progressif de limitation du volume expiratoire (qui n'est toutefois pas complètement réversible), causé par une inflammation chronique des voies aériennes et

du parenchyme pulmonaire (Sutherland and Martin, 2003). La MPOC est majoritairement causée par la fumée de cigarette (Fletcher and Peto, 1977; Sutherland and Martin, 2003). Elle se caractérise par l'infiltration de neutrophiles, de macrophages et de lymphocytes T au niveau de la muqueuse pulmonaire (Barnes, 2003). Cette infiltration entraîne une desquamation de l'épithélium, une hypertrophie des muscles lisses et de la fibrose (Barnes, 2003; Sutherland and Martin, 2003).

## 1.7 Traitements

Bien entendu, puisque l'asthme est une maladie multifactorielle, le traitement nécessite souvent la combinaison de plus d'un produit. Le type de traitement varie aussi en fonction du type d'asthme et en fonction de chaque individu. Dans les lignes qui suivent, nous souhaitons effectuer un simple survol des principaux agents thérapeutiques.

Les glucocorticoïdes représentent sans conteste les médicaments les plus utilisés (Peters-Golden and Sampson, 2003). Ils ciblent principalement l'aspect inflammatoire dans la pathogénèse de l'asthme (Leung and Bloom, 2003). S'ils s'avèrent plutôt efficaces, ils sont cependant impuissants contre le remodelage pulmonaire et engendrent de nombreux effets secondaires. Les agonistes  $\beta_2$ -adrénergiques sont utilisés pour leur effet bronchodilatateur et sont, par conséquent, prescrits lors de la phase aiguë (Shepherd et al., 1981). Les cromoglycates présentent pour leur part une efficacité contre la dégranulation des mastocytes, un traitement associé aux allergies (Storms and Kaliner, 2005). Un autre traitement, plutôt récent, s'impose : il s'agit des anti-leucotriènes. Il démontre jusqu'à présent de bons effets anti-inflammatoires et bronchodilatateurs; nous les aborderons plus en détails à la section 2.4. Dans un dernier temps, mentionnons l'omalizimab (anti-IgE humanisé), un tout nouveau produit sur le marché, qui est prescrit dans les cas d'asthme allergique sévère et qui donne des effets au-delà des attentes (Holgate et al., 2006).

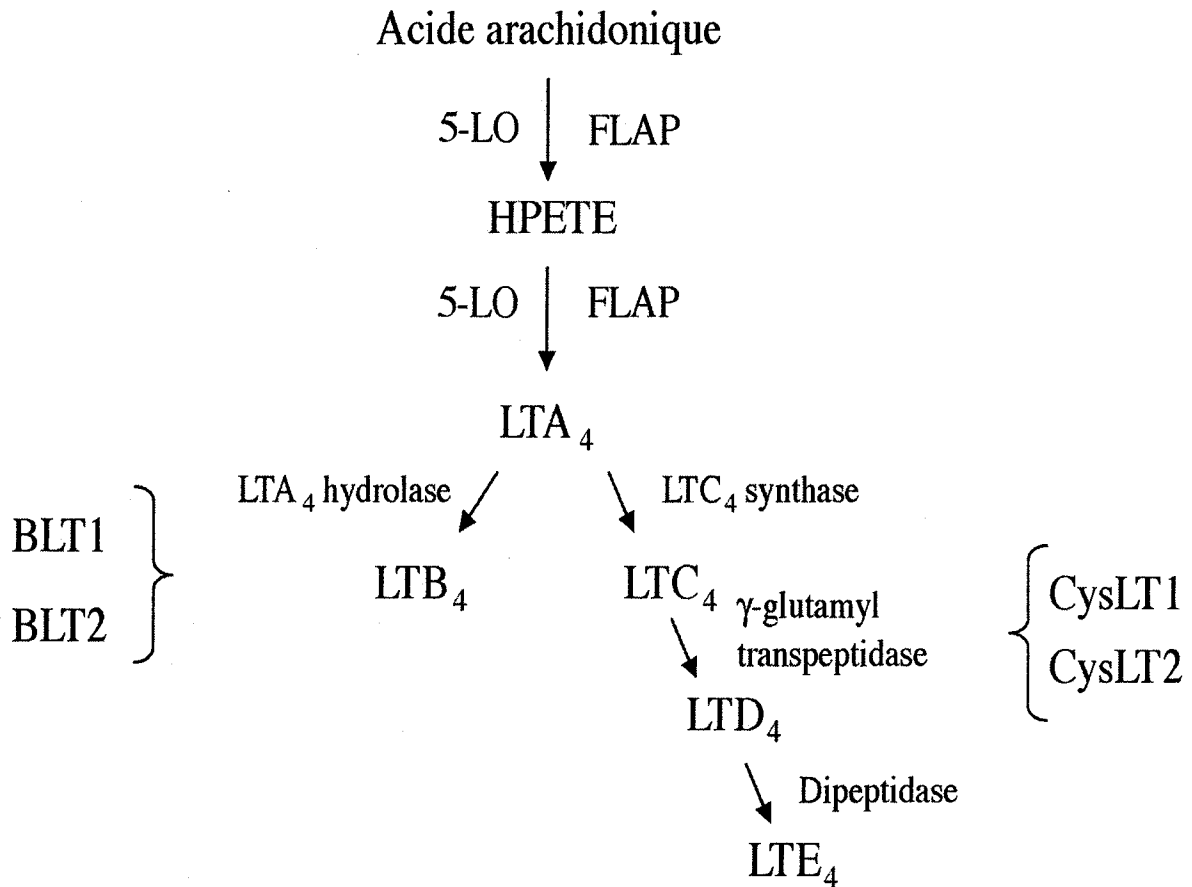
## 2. LES CYSTÉINYL-LEUCOTRIÈNES

### 2.1 Biosynthèse

Les leucotriènes portent leur nom en raison de leur découverte chez les leucocytes (leuco) et la présence, dans leur structure, de trois doubles liens conjugués (triène) (Samuelsson, 1983; Samuelsson, 2000). Les LT font partie de la grande famille d'acides gras oxygénés, les éicosanoïdes.

Ils sont des dérivés du métabolisme oxydatif de l'acide arachidonique via l'action de la 5-lipoxygénase (5-LO) et de la FLAP (5-LO-activating protein) au niveau de la membrane nucléaire (Samuelsson et al., 1987). Ces réactions donnent lieu à la formation du LTA<sub>4</sub>, une molécule très instable, qui peut être transformée en LTB<sub>4</sub>, par la LTA<sub>4</sub> hydrolase (Radmark et al., 1984), ou en LTC<sub>4</sub>, par la LTC<sub>4</sub> synthase (Penrose et al., 1992) (Figure 1). Le LTC<sub>4</sub> est transporté activement à l'extérieur de la cellule où il est rapidement converti en LTD<sub>4</sub> par clivage enzymatique du glutathion à l'aide de la  $\gamma$ -glutamyl-transpeptidase (Anderson et al., 1982). Le LTD<sub>4</sub> est ensuite transformé en LTE<sub>4</sub> par clivage endoprotéolytique d'une glycine par la dipeptidase. Le LTE<sub>4</sub> est excrété dans les urines (Sala et al., 1990) et peut servir à la mesure de la synthèse des cystéinyl-leucotriènes (cysLT). Ces derniers, comprenant le LTC<sub>4</sub>, le LTD<sub>4</sub> et le LTE<sub>4</sub> furent d'abord connus comme la « Slow reacting substance of anaphylaxis » (SRS-A), une substance engendrant la constriction des muscles lisses (Brocklehurst, 1960; Chakravarty and Uvnas, 1960).

Les cysLT sont principalement produits par les éosinophiles, les mastocytes et les basophiles (Devillier et al., 1999). Ils nécessitent une synthèse *de novo*, dont la relâche se fait environ en 45 secondes (Leff, 2001). Cette réaction fait des cysLT des médiateurs inflammatoires rapides, qui peuvent agir autant au niveau de la phase précoce que tardive de l'asthme.



**Figure 1 : Biosynthèse de leucotriènes.** Formation des leucotriènes à partir de l'acide arachidonique, à l'aide de la 5-lipoxygénase (5-LO) et de la « 5-LO activated protein » (FLAP). Le LTA<sub>4</sub> peut être transformé en LTB<sub>4</sub> par la LTA<sub>4</sub> hydrolase ou en LTC<sub>4</sub> par la LTC<sub>4</sub> synthase. Le LTC<sub>4</sub> est transporté à l'extérieur de la cellule où il est transformé en LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>. BLT1 : récepteur de haute affinité pour le LTB<sub>4</sub>, BLT2 : récepteur de faible affinité pour le LTB<sub>4</sub>, CysLT1 et CysLT2, récepteurs de hautes affinités pour les cysLT (LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> et LTE<sub>4</sub>).

La production des leucotriènes peut également s'effectuer par biosynthèse transcellulaire. Ce procédé implique certaines cellules dont l'expression d'enzymes de la cascade des leucotriènes est déficiente ou absente . Par exemple, le neutrophile, qui n'exprime pas de LTC<sub>4</sub> synthase, peut fournir une source importante de LTA<sub>4</sub> aux cellules endothéliales, qui le transforment par la suite en cysLT (Feinmark and Cannon, 1986).

## 2.2 Les récepteurs des CysLT

À ce jour, seulement deux récepteurs ont été caractérisés pour les cysLT. Ce sont deux récepteurs à sept domaines trans-membranaires couplés aux protéines G (RCPG), membres de la famille des RCPG de type rhodopsine (Capra et al., 2006). Selon la nomenclature des leucotriènes, établie par un comité du International Union of Pharmacology (IUPHAR), les récepteurs des cystényl-leucotriènes sont regroupés sous la désignation CysLT (Coleman et al., 1995). La classification des récepteurs CysLT (caractérisation pharmacologique) a été établie selon leur sensibilité aux antagonistes classiques, le montelukast (Jones et al., 1995), le zafirlukast (Krell et al., 1990) et le pranlukast (Keam et al., 2003; Obata et al., 1992), que nous aborderons de façon plus approfondie ultérieurement. La liaison des cysLT au CysLT1 est sensible aux antagonistes classiques alors que leur liaison au CysLT2 est insensible à ces derniers. Récemment le clonage a confirmé l'identification de deux récepteurs distincts chez l'humain, allant de pair avec la nomenclature établie. L'analyse des séquences du CysLT1 et du CysLT2 ne révèle que 38% d'homologie entre les deux récepteurs, principalement dans la région transmembranaire (Heise et al., 2000). Les sections qui suivent permettront de décrire plus en détail chacun de ces récepteurs.



### 2.2.1 CysLT1

Le récepteur CysLT1 a été cloné en 1999 par deux groupes de recherche (Lynch et al., 1999; Sarau et al., 1999). Il s'agit d'une protéine de 337 acides aminés, de poids moléculaire théorique de 38kDa. Le gène du CysLT1 est localisé sur le chromosome X, plus spécifiquement Xq13-21 (Lynch et al., 1999). Le récepteur peut être retrouvé sous forme monomérique, dimérique et oligomérique (Figueroa et al., 2001). Le CysLT1 humain possède 32% d'homologie avec le purinorécepteur PY2 et le récepteur pour le facteur activateur de plaquettes (PAF), ainsi que 28% d'homologie avec le récepteur BLT1 (récepteur de haute affinité pour le LTB<sub>4</sub>) (Lynch et al., 1999). Le CysLT1 possède quatre sites potentiels de N-glycosylation et plusieurs sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A et C (Lynch et al., 1999). L'affinité des agonistes pour le CysLT1 s'énumère dans l'ordre suivant : LTD<sub>4</sub> > LTC<sub>4</sub> > LTE<sub>4</sub> (Lynch et al., 1999). Le EC<sub>50</sub> du LTD<sub>4</sub> est de l'ordre du nanomolaire. La signalisation du récepteur CysLT1 sera décrite plus loin.

La localisation du CysLT1 va de pair avec les fonctions qui lui sont attribuées. Des études d'analyse par buvardage de type Northern ont révélé une forte expression du CysLT1 dans la rate et chez les leucocytes du sang périphérique; elles ont aussi mis au jour la présence du récepteur dans le poumon, le placenta et le petit intestin (Lynch et al., 1999). Lynch et ses collaborateurs ont également confirmé sa présence dans les cellules musculaires lisses bronchiques et les macrophages alvéolaires (Lynch et al., 1999). L'expression dans les leucocytes se retrouve chez les éosinophiles (Figueroa et al., 2001), les monocytes/macrophages (Thivierge et al., 2001), les mastocytes (Mellor et al., 2001), les cellules précurseurs CD34<sup>+</sup> (Figueroa et al., 2001), les lymphocytes B (Lamoureux et al., 2006), les basophiles (Mita et al., 2001), les cellules dendritiques (Thivierge et al., 2006) et une sous-classe de lymphocytes T (Mita et al., 2001).

La modulation du récepteur CysLT1 par les cytokines chez différents types cellulaires a été l'objet de quelques études. Notre équipe a démontré une augmentation de l'expression du CysLT1 par l'IL-5 chez des cellules HL-60 différenciées en éosinophiles (Thivierge et al., 2000). De plus, l'IL-13 induit une expression à la hausse du CysLT1 chez les monocytes et les macrophages humains (Thivierge et al., 2001), chez les cellules musculaires lisses bronchiques (Espinosa et al., 2003) et chez les fibroblastes pulmonaires (Chibana et al., 2003). Le CysLT1 est également augmenté par l'IFN $\gamma$  chez les cellules musculaires lisses bronchiques (Amrani et al., 2001). Toutefois, des résultats non publiés au laboratoire nous démontrent que l'IFN $\gamma$  inhibe l'augmentation de l'expression du CysLT1 induite par l'IL-13 et l'IL-4 chez les monocytes humains. Ceci nous indique donc que l'effet de l'IFN $\gamma$  sur l'expression du CysLT1 peut varier selon le type cellulaire.

Ce n'est qu'à la fin de 2005 qu'a été publiée la séquence promotrice du gène CysLT1 (Woszczek et al., 2005), un outil précieux pour l'étude de l'expression de ce récepteur. En fait, Woszczek et ses collaborateurs ont identifié que le gène du CysLT1 possède 5 exons à épissage variable (4 transcripts) et une région promotrice unique. Ils ont également rapporté la présence, dans le promoteur, de deux sites de liaison pour le facteur de transcription STAT6, nécessaire à la modulation du CysLT1 par l'IL-4. La modulation du CysLT1 par l'IL-4 et l'IL-13 chez les monocytes avait préalablement été publiée par notre équipe (Thivierge et al., 2001). À la suite de l'analyse du promoteur CysLT1, plusieurs sites potentiels pour différents facteurs de transcription sont présents. Parmi ces éléments de réponse, on retrouve : AP-1, GATA, STAT5, STAT6 et ISRE. Cette découverte nous permet de mesurer l'ampleur de la susceptibilité à la modulation du récepteur CysLT1 en contexte inflammatoire.

### **2.2.2 CysLT2**

Le récepteur CysLT2 a été cloné une première fois en 2000, par Heise et ses collaborateurs (Heise et al., 2000), dont les résultats ont été confirmés par deux autres groupes durant la même année (Nothacker et al., 2000; Takasaki et al., 2000). Le

CysLT2 est une protéine constituée de 346 acides aminés et comporte, comme le CysLT1, quatre sites potentiels de N-glycosylation et plusieurs sites potentiels de phosphorylation par les protéines kinases A et C (Heise et al., 2000). L'affinité des agonistes pour le récepteur CysLT2 (différente de celle du CysLT1) est de l'ordre du nanomolaire et se lit comme suit : LTC<sub>4</sub>=LTD<sub>4</sub>>LTE<sub>4</sub> (Heise et al.). Le CysLT2 démontre une distribution intéressante, plus ubiquiste que le CysLT1, avec une expression plus prononcée dans des régions comme le cerveau, le cœur, les cellules endothéliales, la surrénale et les leucocytes (Heise et al., 2000; Nothacker et al., 2000). L'expression du CysLT2 a été détectée chez les éosinophiles (Heise et al., 2000), les mastocytes (Mellor et al., 2003) et les monocytes dans les voies aériennes supérieures de patients atteints de rhinite allergique (Figuerola et al., 2003). Enfin, une forte concentration d'ARNm de CysLT2 a été découverte par hybridation *in situ* chez des macrophages interstitiels de poumons humains (Heise et al., 2000).

La séquence promotrice du récepteur CysLT2 demeure toujours inconnue. À ce jour, très peu d'études sur la modulation de l'expression du CysLT2 ont été répertoriées. Toutefois, nous savons que le récepteur est régulé à la hausse par l'IFN $\gamma$  chez les cellules musculaires lisses bronchiques (Amrani et al., 2001). L'IL-4 induit également son expression chez les cellules endothéliales dérivées de cordons ombilicaux (HUVEC) (Lotzer et al., 2003). Il est donc bien évident que beaucoup de travaux sur la régulation du CysLT2 demeurent nécessaires.

Avant d'examiner la signalisation qui constitue le vif de notre sujet, attardons-nous aux rôles physio-pathologiques des cysLT.

### **2.3 Effets biologiques des cystéinyl-leucotriènes**

Les cystéinyl-leucotriènes sont des médiateurs lipidiques impliqués dans plusieurs processus inflammatoires. D'ailleurs, les cysLT ont la capacité d'induire des symptômes similaires à ceux de l'asthme (Sampson, 1996). En plus de leurs implications dans les

maladies respiratoires, les CysLT semblent jouer un rôle dans d'autres pathologies, comme les maladies cardiovasculaires et gastrointestinales, les maladies de la peau et des désordres immunitaires (Capra, 2004; Folco et al., 2000; Sampson et al., 2003).

Plusieurs études effectuées sur des modèles animaux ont mis en lumière les effets physio-pathologiques produits par les cysLT. Nombre de données datent des années 1980 et 1990. Cependant, avec la venue du clonage des différentes enzymes de la cascade de synthèse des leucotriènes, ajoutée au clonage des récepteurs ainsi que l'arrivée des antagonistes spécifiques, une autre vague d'études plus récentes est apparue. D'ailleurs, la souris déficiente en LTC<sub>4</sub> synthase s'est imposée comme étant un modèle animal concluant pour étudier le rôle physio-pathologique des cysLT (Kim et al., 2006). C'est qu'en fait, la LTC<sub>4</sub> synthase représente la dernière enzyme nécessaire à la synthèse des CysLT (voir schéma sur la synthèse des leucotriènes). Ainsi, chez les souris déficientes en LTC<sub>4</sub> synthase, sensibilisées et provoquées à l'ovalbumine, l'inflammation pulmonaire s'avérait réduite. Plus précisément, en comparaison avec les souris témoins, les souris qui n'exprimaient pas la LTC<sub>4</sub> synthase démontraient une diminution de l'infiltration d'éosinophiles, de l'hyperplasie des cellules à mucus, de l'activation et de l'accumulation intraépithéliale de mastocytes (Kim et al., 2006). La production d'IgE, IgG1, de cytokines Th2 et l'hyper-réactivité bronchique induite par la méthacholine étaient également diminuées (Kim et al., 2006). Bref, ce modèle confirme le rôle des CysLT dans l'inflammation pulmonaire.

Tel que mentionné précédemment, les cysLT sont impliqués de façon importante dans l'asthme et ce, à différents niveaux. Les cysLT s'avèrent de très puissants broncoconstricteurs chez les patients asthmatiques (Bisgaard and Groth, 1987; Drazen, 1998; Smith et al., 1990). En effet, le LTC<sub>4</sub> et le LTD<sub>4</sub> génèrent tous deux un broncospasme environ 1000 fois plus puissant que l'histamine (Drazen, 1998). L'hypersécrétion de mucus est également une caractéristique fondamentale de l'obstruction des voies aériennes induite par les cysLT (Marom et al., 1982). Ceux-ci entraînent, en plus, l'hyperplasie des cellules à mucus et la diminution du transport mucociliaire (Devillier et al., 1999). De façon générale, les cysLT sont classés parmi les

molécules pro-inflammatoires. Leur participation dans la phase tardive de l'asthme est bien reconnue. Ce sont effectivement de très bons agents chimiotactiques. Ils participent au recrutement et à la survie des éosinophiles dans le poumon (Becler et al., 2002; Lee et al., 2000; Minoguchi et al., 2002; Underwood et al., 1996). De surcroît, ils sont impliqués dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire, qui génère l'oedème pulmonaire (Garcia et al.).

Plusieurs évidences suggèrent la participation des cysLT dans le remodelage pulmonaire. À ce propos, notre équipe a démontré une participation du LTD<sub>4</sub> dans la prolifération des cellules musculaires lisses bronchiques (Espinosa et al., 2003). Ce dernier peut également induire la chimiotaxie des fibroblastes (Kato et al., 2005) et la migration des cellules musculaires lisse (Parameswaran et al., 2002). De plus, le LTD<sub>4</sub> conduit à l'hyperplasie des glandes à mucus, le dépôt de collagène sous les cellules épithéliales et dans l'interstice au site d'infiltration leucocytaire. Il augmente aussi la MMP-1, une métalloprotéinase impliquée dans la biodisponibilité de l'IGF-1 (Rajah et al., 1999). Il est également possible de faire un parallèle entre la concentration des cysLT et certaines pathologies pulmonaires. L'expression des cysLT se trouve augmentée dans l'asthme (Lex et al., 2006), l'asthme sévère (Green et al., ; Levy et al., 2005), la rhinite allergique (Miadonna et al., 1987) et la fibrose kystique (Spencer et al., 1992). Soulignons enfin que dans des modèles animaux, les antagonistes spécifiques du CysLT1 ont la capacité de réduire le remodelage pulmonaire (Henderson et al., 2002).

Jusqu'à présent, et au meilleur de nos connaissances, le récepteur CysLT1 serait le principal responsable des effets des cysLT dans les voies aériennes. C'est ce que tendent à prouver les fonctions mentionnées précédemment, puisqu'elles proviennent majoritairement d'études faites à l'aide des antagonistes spécifiques du CysLT1. Ceci n'élimine en rien le rôle potentiel du CysLT2 dans la pathogénèse asthmatique : il n'a tout simplement pas encore été étudié.

Notons au surplus que les souris déficientes en CysLT1 et CysLT2 n'ont pas été très exploitées jusqu'à ce jour. Pour chaque récepteur, une seule étude a été répertoriée et

les conclusions ne s'avèrent pas très révélatrices. En examinant les souris déficientes en CysLT1, tout indique que ces récepteurs sont impliqués dans la perméabilité vasculaire lors de réponse inflammatoire aiguë (Maekawa et al., 2002). Les souris déficientes en CysLT2 témoignent quant à elles de l'implication de ce récepteur dans la perméabilité vasculaire, de même que dans la fibrose pulmonaire induite par la bléomycine (Beller et al., 2004).

Malgré le peu de connaissances sur le rôle du récepteur CysLT2 dans la pathogénèse asthmatique, quelques relations entre le gène du CysLT2 et l'asthme ont été proposées. D'abord, le gène du CysLT2 se trouve localisé sur le chromosome 13q14, une région reliée à l'asthme allergique (Cookson, ; Heise et al., 2000). Un polymorphisme du récepteur CysLT2, qui diminue sa réponse au LTD<sub>4</sub>, est associé à la résistance à l'asthme (Pillai et al., 2004). Une autre variante du CysLT2 a également été associée à l'atopie chez la population de Tristan da Cunha (Thompson et al., 2003).

Dans un dernier temps, le récepteur CysLT2 est soupçonné depuis longtemps d'avoir une implication dans la régulation cardiovasculaire. Sa localisation dans le système cardiovasculaire concorde avec cette hypothèse et deux équipes lui suggèrent des fonctions dans l'athérosclérose (Lotzer et al., 2003; Sjostrom et al., 2003). Le récepteur CysLT2 devient donc de plus en plus fascinant à étudier, de par sa localisation et les hypothèses émergentes sur ses rôles physiologiques.

## **2.4 Antagonistes**

Plus d'une stratégies peut être utilisée afin d'inhiber les effets indésirables des leucotriènes dans la physiopathologie humaine. Il existe des inhibiteurs de différentes enzymes impliquées dans la biosynthèse des leucotriènes, dont les inhibiteurs de la 5-LO, commercialisés par Abbott sous le nom Zileuton (Zyflo®). Cet agent inhibe à la fois la synthèse de LTB<sub>4</sub> et des cysLT (Bell et al., 1992). Le Zileuton a la capacité d'inhiber l'asthme induite par l'aspirine (Israel et al., 1993).

La seconde tactique mise en oeuvre pour contrer les dommages générés par les cysLT consiste à bloquer les récepteurs. Durant de nombreuses années, les compagnies pharmaceutiques ont mis au point les antagonistes spécifiques du récepteur CysLT1 : elle y sont parvenues en passant par plusieurs générations de molécules. Une fois la spécificité, l'efficacité et la facilité d'administration atteintes, les antagonistes se sont retrouvés sur le marché. Parmi les antagonistes classiques, on reconnaît le Montelukast (Singulair®) (Jones et al., 1995), le Zafirlukast (Accolate®) (Krell et al., 1990) et le Pranlukast (Onon®) (Keam et al., ; Obata et al., 1992). Ces molécules sont présentement utilisées pour le traitement de l'asthme. Deux des avantages considérables des antagonistes des leucotriènes (LTA) sont la facilité d'administration (*per os*, une à deux prises quotidiennes) et la sécurité, c'est-à-dire l'absence d'effets secondaires (Capra et al., 2006). Le montelukast peut être prescrit chez les enfants à partir de l'âge de 2 ans (Knorr et al., 2001; Muijsers and Noble, 2002; Weisberg, 2000). Les LTA sont souvent combinés avec d'autres médicaments, tels que les glucocorticoïdes et/ou les  $\beta 2$  agonistes. Les LTA permettent ainsi de réduire la quantité nécessaire de ces médicaments (Capra et al., 2006).

Les LTA se présentent comme des outils indispensables pour mieux comprendre les rôles du CysLT1. De plus, la majorité des connaissances liés aux fonctions de ce récepteur proviennent d'études faites à l'aide des antagonistes classiques.

Près de 40% des asthmatiques adultes répondent bien aux LTA, et le pourcentage est supérieur chez les enfants. Il n'en demeure pas moins que l'effet bénéfique des antagonistes spécifiques du CysLT1 est somme toute surprenant. En considérant que l'asthme est multifactoriel, le blocage d'un seul médiateur qui génère autant d'effets positifs s'avère très intrigant. La participation des cysLT à plusieurs niveaux de la maladie constitue une hypothèse tout à fait plausible. Cependant, est-ce le résultat d'effets non spécifiques des antagonistes ou est-ce vraiment un facteur clé de la pathogénèse? Bien des questions restent sans réponse et encore bien des études sont nécessaires avant de comprendre tous les impacts des cysLT sur la physiologie humaine.

Pour continuer, notons qu'il existe également le BayU9773, un antagoniste non-spécifique, qui bloque à la fois le CysLT1 et le CysLT2. Un bémol persiste toutefois quant aux effets de cette molécule : c'est qu'en plus, le BayU9773 possède des activités d'agoniste partiel pour CysLT2 (Sjostrom et al., 2003). Par conséquent, l'utilité de cet antagoniste demeure discutable. Enfin, il n'existe aucun antagoniste spécifique pour le récepteur CysLT2. Aucun indice ne laisse croire à la commercialisation d'une telle molécule dans un avenir rapproché. Néanmoins, un antagoniste spécifique pour le CysLT2 serait nécessaire afin d'approfondir les mécanismes des cysLT.

### **3. LA SIGNALISATION**

#### **3.1 Signalisation des RCPG**

Le CysLT1 et le CysLT2, les deux récepteurs qui nous intéressent, font partie de la grande famille des RCPG (Récepteur couplé aux protéines G). La signalisation étant le sujet principal de cette thèse, nous ferons un résumé non exhaustif des signalisations de ce type de récepteur.

Les RCPG sont couplés à un complexe hétérotrimérique protéique, surnommé protéine G, dont la composition diffère d'un type de récepteur à un autre et selon l'état d'activation. Le complexe de protéines G hétérotrimériques est composé des sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$  et  $\gamma$  (Gilman, 1987; Neer, 1995). Il existe quatre familles de la sous-unité  $\alpha$  :  $G_{\alpha s}$ ,  $G_{\alpha i}$ ,  $G_{\alpha q/11}$  et  $G_{\alpha 12/13}$  (Farfel et al., 1999). Dans un état inactif, la sous-unité  $\alpha$  est liée à un GDP et forme un complexe trimérique avec les sous-unités  $\beta\gamma$  (Johnson and Druey, 2002). À la suite de la liaison d'un agoniste avec son récepteur, le GDP est remplacé par un GTP, ce qui engendre la dissociation du complexe hétérotrimérique et l'activation des cascades de signalisation (Bouvier et al. 2000). La signalisation induite par les RCPG dépend de la nature de la ou des protéines G associées à ce même



récepteur. Ainsi, les protéines G $\alpha$ s sont reconnues pour leur induction de l'enzyme adénylate cyclase, menant à l'augmentation des niveaux d'adénosine monophosphate cyclique (AMPc) (Forse, 2000). Par contre, les protéines G $\alpha$ i entraînent plutôt une inhibition de l'adénylate cyclase (Neves et al., 2002). Pour ce qui est de la sous-unité G $\alpha$ q, elle engendre l'activation de la phospholipase C $\beta$ , qui conduit à la génération de diacylglycérol (DAG) et d'inositol tri-phosphate, qui résulte en une relâche de calcium du réticulum endoplasmique (Neves et al., 2002). Finalement, les protéines G $\alpha$ 12/13 sont associées à l'activation de la famille des petites protéines G Rho (Johnson and Druey, 2002). En somme, il ne s'agit ici que d'un bref résumé de la signalisation des RCPG, puisque chaque récepteur possède sa propre combinaison de signalisation.

### 3.2 NF- $\kappa$ B

Le facteur nucléaire  $\kappa$ B est un facteur de transcription impliqué dans plusieurs phénomènes, qu'ils soient immuns, inflammatoires ou de réponses aiguës. Le NF- $\kappa$ B est un homo ou hétérodimère composé des différents membres de la famille de protéines Rel : NF- $\kappa$ B1(p50), NF- $\kappa$ B2(p52), c-Rel, RelA (p65) et RelB (Hayden and Ghosh, 2004; Zingarelli et al., 2003). Le complexe le plus abondant reste l'hétérodimère p50-p65 (Senftleben and Karin, 2002). Ces deux sous-unités lient l'ADN, mais il n'y a que RelA qui possède une activité transcriptionnelle. Dans les cellules au repos, le complexe NF- $\kappa$ B est retrouvé sous forme inactive; il est séquestré dans le cytoplasme par les protéines inhibitrices I $\kappa$ B (IKK $\alpha$ , IKK $\beta$  et NEMO (IKK $\gamma$ )), qui s'associent avec la sous-unité p65 (Baeuerle and Baltimore, 1989). En réponse à divers stimuli, la sous-unité I $\kappa$ B $\alpha$  est d'abord phosphorylée sur ses résidus sérine 32 et 36 par une kinase IKK, puis rapidement ubiquitinée et dégradée au protéasome de type 26S (Palombella et al., 1994; Traenckner et al., 1995). Cette réaction permet au facteur NF- $\kappa$ B libre de transloquer dans le noyau pour y activer la transcription de différents gènes. Le NF- $\kappa$ B peut être activé par deux voies : la voie classique, que nous venons de décrire et qui sera étudiée plus spécifiquement lors de nos travaux, et la voie alternative que nous n'aborderons pas ici (Hayden and Ghosh, 2004).

### 3.3 AP-1

Le facteur de transcription AP-1 (pour « Activator Protein 1) participe à plusieurs phénomènes biologiques dont la prolifération cellulaire, l'activation neuronale et la régulation de l'apoptose en réponse à un stress (Eferl and Wagner, 2003; Kaminska et al., 2000). La composition moléculaire des complexes AP-1 est hétérogène et comprend des membres des familles Jun et Fos. Les protéines Jun (c-Jun, JunB, JunD) peuvent former des homodimères ou des hétérodimères avec des membres de la famille Fos (Kaminska et al., 2000). Cependant, les protéines Fos (c-Fos, FosB, Fra-1, Fra-2) ne forment que des hétérodimères avec les membres Jun. Les complexes AP-1 se lient sur une séquence d'ADN consensus TGA CTCA (Angel and Karin, 1991). Cette dernière est mieux connue sous l'acronyme TRE, désignant « 12-O-tetradecanoyl phorbol 13-acetate (TPA)-responsive element », puisqu'elle module l'expression de plusieurs gènes cibles de TPA (Hess et al., 2004). Il arrive que différents dimères préfèrent lier d'autres éléments de réponse, comme le site de liaison CRE (cAMP-response element), dont la séquence diffère par un seul nucléotide (TGACGTCA) (Eferl and Wagner, 2003). Ceci entraîne des réactions croisées.

La régulation de l'activité de AP-1 s'accomplit d'abord par la composition de ses complexes. Ainsi l'expression de ses membres, c'est-à-dire la quantité (l'abondance) des différentes sous-unités des complexes AP-1, représente un facteur limitant pour la formation des dimères (Kaminska et al., 2000). Différentes combinaisons semblent entraîner des impacts tout à fait contradictoires. Ainsi, la nature du complexe lui confère sa stabilité, sa spécificité de liaison à l'ADN et son affinité (Kaminska et al., 2000). La régulation se fait également au niveau transcriptionnel et post-transcriptionnel. L'expression de AP-1 peut être induite par différents stimuli externes qui conduisent à l'activation de MAPKinases (Karin, 1995; Karin et al., 1997). L'élément de réponse SRE (serum response element) détient principalement le contrôle de l'expression de la

sous-unité c-fos. De son côté, c-jun est contrôlé par MEF (myocyte-enhancer factor) et par AP-1 lui-même (Eferl and Wagner, 2003).

La modification post-transcriptionnelle consiste en la phosphorylation des sous-unités, qui favorise la stabilité des composantes AP-1, la capacité de liaison à l'ADN et l'activation de la transcription (Karin et al., 1997). Cette régulation passe majoritairement par l'intermédiaire des kinases de la famille des MAPkinases (Karin, 1995). De ce fait, la phosphorylation de c-Jun par JNK sur les résidus sérine 63 et 73 augmente son potentiel de transactivation (Hibi et al., 1993; Karin, 1995; Minden et al., 1994). D'autres protéines kinases peuvent phosphoryler les sous-unités AP-1, dont la « glycogène-synthase-kinase-3 $\beta$  » (GSK3), la « caseine-kinase II » (CKII) et la « ribosomal S6 kinase2 (RSK2) (Eferl and Wagner, 2003).

L'activité transcriptionnelle de AP-1 peut aussi être influencée par certains coactivateurs de transcription, dont CREB « cAMP responsive element binding protein » (Karin et al., 1997), CBP « CREB binding protein » (Bannister et al., 1995; Kwok et al., 1994) et JAB1 « Jun activation domain binding protein 1 » (Claret et al., 1996).

### 3.4 PKC

Les protéines kinases C (PKC) forment une famille de sérines/thréonines kinases composée de plusieurs membres divisés en trois groupes : les PKC classiques, les PKC nouvelles et les PKC atypiques (Newton, 1997). Elles sont classées selon leur dépendance envers le calcium et le diacylglycérol. Parmi les classiques, on retrouve PKC  $\alpha$ ,  $\beta$ I,  $\beta$ II et  $\gamma$  qui sont dépendantes du calcium et du DAG. La famille des PKC nouvelles comprend les PKC $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\theta$  et  $\eta$ , qui sont régulées par le DAG. Finalement, les PKC atypiques, PKC  $\zeta$ ,  $\iota$  et  $\lambda$  s'avèrent indépendantes à la fois du calcium et du DAG.

La régulation des PKC se fait par l'entremise de ses co-facteurs, sa phosphorylation et sa localisation cellulaire (Newton, 1997). La PKC immature est

phosphorylée par la PDK1, ce qui permet une autophosphorylation sur son propre segment C-terminal. Cette réaction lui confère un état de compétence enzymatique, nécessaire à son activité catalytique (Newton, 2003). La position de la PKC à un site spécifique dans la cellule lui permet de répondre de façon efficace aux seconds messagers et lui facilite l'accès à ses substrats (Newton, 1997). La PKC peut ainsi être activée par le DAG (et le calcium pour les PKC classiques) qui est produit à la suite de la stimulation d'un récepteur (Spitaler and Cantrell, 2004). Le DAG, qui augmente l'affinité de la PKC pour les phospholipides membranaires (phosphatidylsérine), recrute la PKC à la membrane et l'active. À ce titre, la PKC est la principale molécule cible de l'action du DAG et de ses homologues pharmacologiques, les phorbols esters (PMA ou PdBu) (Nishizuka and Kikkawa, 2003).

La littérature concernant l'activation des PKC à partir des RCPG est somme toute substantielle. Nous savons donc que la principale voie de signalisation des RCPG menant aux PKC se fait par l'activation d'une protéine  $G\alpha_q$  (Neves et al., 2002). Celle-ci engendre, comme mentionné précédemment, l'activation de la phospholipase  $C\beta$ . Cette cascade résulte en une libération de DAG et en une relâche de calcium intracellulaire, le tout sous la gouverne des inositols triphosphates ( $IP_3$ ) (Neves et al., 2002).

Pour conclure, notons également que les PKC jouent un rôle majeur dans la transduction de signaux impliqués dans les réponses immunes, innées et adaptatives chez les mammifères (Spitaler and Cantrell, 2004).

### **3.5 GATA**

Le GATA, un facteur de transcription, dispose d'un domaine de liaison à l'ADN hautement conservé et sa structure consiste en un motif à doigts de zinc (Mackay et al., 1998). Six protéines GATA ont déjà été identifiées chez les vertébrés et elles sont classées selon leur patron d'expression. Les protéines GATA se subdivisent en deux

groupes. D'une part, les GATA-1, -2 et -3 s'expriment principalement chez les cellules hématopoïétiques où elles régulent la différenciation cellulaire (Orkin et al., 1998). D'autre part, les GATA-4, -5 et -6, se retrouvent dans différents tissus mésodermiques et endodermiques, tels que le cœur, le foie, les poumons, les gonades et les intestins; elles y jouent un rôle important dans la régulation de l'expression de certains gènes (Molkentin, 2000). La séquence de liaison à l'ADN et l'origine du nom GATA est la suivante : (A/T)GATA(A/T) (Ko and Engel, 1993; Merika and Orkin, 1993). Enfin, la régulation des protéines GATA est peu répertoriée et encore mal connue.

## **4. SIGNALISATION DES RÉCEPTEURS CYSLT1 ET CYSLT2**

### **4.1 Signalisation du CysLT1**

La signalisation du récepteur CysLT1 est un domaine encore sous investigation. Bien que quelques études aient été repertoriées à ce sujet, la recherche sur ce récepteur n'en est encore qu'à ses balbutiements. Les toutes premières données proviennent d'une étude sur la caractérisation du récepteur CysLT1. Chez les cellules HEK293 transfectées avec le CysLT1, le récepteur ne se couple pas à une protéine G sensible à la toxine pertussique (Sarau et al., 1999), éliminant ainsi l'implication d'une protéine  $G_{\alpha i}$ , du moins dans ce type cellulaire. D'autres travaux sur des tissus animaux ont démontré, de leur côté, une association du récepteur CysLT1 avec des membres de la famille  $G_{\alpha q/11}$  (Mong et al., 1988). Les études sur le clonage du récepteur ont pour leur part révélé une mobilisation du calcium intracellulaire par le CysLT1, favorisant une autre fois la classe de protéines  $G_{q/11}$  (Sarau et al., 1999).

D'autre part, soulignons qu'une étude menée chez une lignée cellulaire de type monocytaire, les cellules THP-1, a démontré que la chimiotaxie induite par le  $LTD_4$  est sensible à la toxine pertussique (PTX) (Hoshino et al.). Ce phénomène indique par conséquent l'implication d'une protéine  $G_{\alpha i}$ , indiquant que la protéine G associée au

récepteur diffère d'un type cellulaire à un autre et selon la voie de signalisation étudiée. La même étude rapporte une activation des protéines PKC $\alpha$  et Raf-1, à la suite d'une stimulation par le LTD $_4$ . Contrairement aux expériences de chimiotaxie, cette voie de signalisation semble insensible à la toxine pertussique chez les THP-1. Une autre lignée monocyttaire, les U937 différenciées par un traitement au diméthylsulfoxyde (DMSO), active, en réponse au LTD $_4$ , des protéines MAPKinases (Erk) (Capra, 2004). Il s'agit d'une réaction dépendante de la petite protéine G Ras et de la PLC. La réaction est aussi sensible à la toxine pertussique. Toujours chez les cellules U937 différenciées, le même groupe avait démontré une libération calcique partiellement sensible à la PTX et avait suggéré un rôle pour une sous-unité  $\beta$  du complexe hétérotrimérique de protéine G (Capra et al., 2003).

L'équipe du Dre A. Sjolander a effectué beaucoup de travaux sur les effets du LTD $_4$  chez une lignée de cellules épithéliales intestinales, les Int407. Dans ces cellules, le LTD $_4$  entraîne l'activation de différentes PKC, plus spécifiquement les PKC $\alpha$ ,  $\delta$  et  $\epsilon$  (Thodeti et al., 2001). De plus, ils ont démontré que le LTD $_4$  induit la formation de fibres de stress, impliquant la PKC $\delta$  et la petite protéine G RhoA (Massoumi et al., 2002). Récemment, ces chercheurs ont également confirmé que la protéine G $\alpha$ 12 était en amont de RhoA lors de l'induction des fibres de stress (Nielsen et al., 2005). Toujours chez les Int407, le LTD $_4$  engendre l'activation des MAP Kinases Erk1/2 de façon indépendante de Ras et dépendante de la PKC $\epsilon$ , (Paruchuri et al., 2002). En outre, l'activation des Erk 1/2 est précédée de l'activation de la protéine G $\alpha$ i3 (Nielsen et al., 2005). Finalement, la migration de ces cellules induite par le LTD $_4$  implique l'activation des protéines PI3Kinase et Rac (Paruchuri et al., 2005).

Grâce à des études réalisées à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, les résultats nous portent à croire que la production de cytokines par les cellules épithéliales stimulées par LTD $_4$  requiert la participation de la kinase p38 (Perng et al., 2006).

En définitive, la compréhension des voies de signalisation générées par le CysLT1 reste encore fragmentaire. Il sera important que d'autres pistes soient explorées.

## 4.2 Signalisation du CysLT2

La signalisation du récepteur CysLT2 constitue un champ d'étude totalement inconnu. Cette situation est sans doute causée par l'absence d'antagoniste spécifique pour ce récepteur. De plus, les cellules possédant le CysLT1 expriment généralement aussi le CysLT2, rendant l'étude spécifique de chacun des récepteurs très difficile. Jusqu'à présent, les cellules qui semblent les plus adéquates pour l'étude de ce récepteur demeurent les cellules endothéliales dérivées de cordons ombilicaux (HUVEC). En fait, ces cellules n'expriment que des niveaux très faibles (quelques transcripts) du récepteur CysLT1 et des concentrations élevées du récepteur CysLT2 (Sjostrom et al., 2003). Qui plus est, toujours chez les HUVEC, le LTD<sub>4</sub> induit une mobilisation de calcium qui n'est pas inhibée par les antagonistes classiques du CysLT1 (Lotzer et al., 2003). Les effets engendrés par les cysLT chez les HUVEC seraient par conséquent le résultat de l'activation du CysLT2. Finalement, la mobilisation de calcium obtenue chez les HUVEC demeure le seul événement de signalisation généré par le CysLT2 ayant été rapporté (Lotzer et al., 2003; Sjostrom et al., 2003).

## 5. LES OBJECTIFS DE L'ÉTUDE :

Les cystéinyl-leucotriènes (cysLT) sont des médiateurs lipidiques impliqués dans la pathogénèse de l'asthme. Malgré l'utilisation en clinique des antagonistes classiques du récepteur CysLT1, les mécanismes cellulaires et moléculaires des cysLT sont encore peu connus. De surcroît, le rôle et la signalisation du récepteur CysLT2 restent toujours à définir.

Une des caractéristiques importantes de l'asthme est l'inflammation chronique, qui implique l'infiltration de plusieurs populations leucocytaires, ainsi qu'une panoplie de protéines inflammatoires dans les voies aériennes. La concentration des cysLT et des neutrophiles est augmentée chez les asthmatiques sévères. L'IL-8 est quant à elle une chimiokine importante pour le recrutement des neutrophiles et son expression est également augmentée dans l'asthme sévère.

Les objectifs de cette thèse étaient d'explorer la biologie des cystéinyl-leucotriènes, dans le but de découvrir de nouvelles fonctions et d'approfondir les connaissances sur la signalisation des différents récepteurs CysLT. Tout d'abord, les objectifs consistaient à établir par quels mécanismes les cysLT pouvaient participer aux pathologies pulmonaires impliquant principalement les cellules polymorphonucléées. Nous avons premièrement exploré l'impact des cysLT, via le CysLT1 et le CysLT2, sur la chimiotaxie des cellules inflammatoires par un mécanisme impliquant la production de chimiokines. Puisque les neutrophiles sont impliqués dans différentes pathologies pulmonaires dont l'asthme sévère et la maladie pulmonaire obstructive chronique, nous avons soulevé l'hypothèse de la participation des cysLT dans ces phénomènes. Nous avons mis une emphase plus spécifique sur la chimiokine IL-8. Deuxièmement, un des objectifs particulièrement importants des nos études était de bien définir la signalisation spécifique à chacun des récepteurs. À ce titre, nous avons tenté d'obtenir plus d'informations sur les voies de signalisation induites par les récepteurs CysLT menant à la production de chimiokines. Nous savions déjà que les facteurs de transcription responsables de la régulation de la majorité des chimiokines étaient le facteur nucléaire (NF)- $\kappa$ B et la protéine activatrice 1 (AP-1). Malgré la participation de ces voies de



signalisation dans plusieurs processus inflammatoires, l'utilisation de celles-ci par les récepteurs CysLT1 et CysLT2 n'avait pas encore été dévoilée.

De plus en plus d'évidences suggèrent la participation des cysLT dans le processus plutôt irréversible des maladies pulmonaires, c'est-à-dire dans le remodelage pulmonaire. Dans ce domaine, les mécanismes restent toujours à définir. Notre hypothèse de recherche était donc la suivante : les cysLT participent au remodelage pulmonaire par l'intermédiaire de la furine et de ces différents substrats. Notre objectif était de vérifier l'impact des cysLT sur l'expression de la furine, ainsi que d'étudier les mécanismes de régulation impliqués. Nous étions au fait que la convertase de proprotéine furine s'avérait responsable de l'activation/maturation de plusieurs molécules fibrogéniques et angiogéniques. Dans cette optique, nous avons donc analysé les conséquences de la modulation de la furine par les cysLT sur les substrats de la furine impliqués dans le remodelage pulmonaire.

## **CHAPITRE I**

### **Le leucotriène D<sub>4</sub> induit la production d'IL-8 par l'intermédiaire du récepteur CysLT1: Implication des éléments AP-1 et NF-κB**

Charles Thompson , Alexandre Cloutier , Ynuk Bossé, Christian LeGouill, Pierre Larivée, Patrick P. McDonald, Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski

Article publié dans la revue : *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology*, le 29 juin 2006 [Epub ahead of print]

## INTRODUCTION

### LES CHIMIOKINES

Tout d'abord, soulignons que l'inflammation chronique dans l'asthme est le résultat d'une infiltration cellulaire et de plusieurs facteurs inflammatoires. Parmi ceux-ci, on retrouve de petites molécules que l'on nomme chimiokines.

La grande famille des chimiokines est composée de quatre groupes, les CC, les CXC, les C et les CX<sub>3</sub>C. Comme leur nom l'indique, les chimiokines constituent des facteurs importants pour le recrutement de cellules inflammatoires. Il s'agit de polypeptides de 8 à 14 kD (Hoffmann et al., 2002), dont la grande famille compte environ 50 membres à ce jour. Les chimiokines CXC ciblent principalement les neutrophiles et les lymphocytes, alors que les chimiokines CC ciblent une plus grande variété de cellules, dont les macrophages, les éosinophiles, les basophiles et les cellules dendritiques (Zimmermann et al., 2003). La classe la plus imposante est celle des CC chimiokines, nommée ainsi à cause de leurs deux premières des quatre cystéines conservées et adjacentes. La plus étudiée des CC chimiokines reste sans aucun doute le MCP-1 (CCL2), qui est un agoniste pour les monocytes, les cellules T mémoires et les basophiles (Charo and Taubman, 2004). En fait, le MCP-1 est l'une des chimiokines majeures responsable du recrutement des monocytes au site d'inflammation dans l'athérosclérose (Gu et al.). Ce groupe comprend également l'éotaxine (CCL11), RANTES (CCL5), « macrophage inflammatory protein 1 $\alpha$  », (MIP-1 $\alpha$ ) (CCL3) et MIP-1 $\beta$  (CCL4).

Pour approfondir nos études, nous avons privilégié le modèle de l'IL-8 (CXCL8), le prototype de la famille des chimiokines sur lequel nous mettrons l'emphasis. L'IL-8 est une molécule de la classe des CXC chimiokines, lesquelles comprennent un acide aminé simple entre les deux premières cystéines conservées (Samson et al., 1999). L'IL-8 est très bien caractérisée, autant au niveau de sa structure tridimensionnelle, de son récepteur, que de sa régulation. Sa principale caractéristique sur le plan biologique est son puissant effet sur la chimiotaxie et sur la survie des cellules polymorphonucléaires (Harada et al., 1994). D'autres fonctions lui ont aussi été attribuées dans des domaines comme

l'angiogénèse, la progression tumorale, la mitose, le remodelage tissulaire, ainsi que dans l'inflammation pulmonaire aiguë (Baggiolini and Clark-Lewis, 1992).

En situation physiologique normale, l'IL-8 a la particularité d'être une molécule pratiquement non sécrétée (Hoffmann et al., 2002). Cependant, sa production est rapidement inductible par une variété de stimuli pro-inflammatoires, dont le TNF- $\alpha$  (Brasier et al., 1998) et par des infections bactériennes (Aihara et al., 1997; Hobbie et al., 1997) ou virales (Mastrorade et al., 1998; Murayama et al., 1997). La régulation de l'expression de l'IL-8 se fait principalement au niveau transcriptionnel. D'ailleurs, la région en 5' du gène de l'IL-8, de la position -133 à -1, s'avère essentielle et suffisante pour sa régulation transcriptionnelle (Harant et al., 1996; Mukaida et al., 1990). Cette région comprend trois sites de liaisons spécifiques pour trois facteurs de transcription très importants, c'est-à-dire, AP-1 (-126, -120), NF-IL-6 (-94, -81) et NF- $\kappa$ B (-80, -70) que nous avons discutés précédemment (Hoffmann et al., 2002). La proximité des facteurs de transcription suggère la formation de complexes de protéines, que l'on surnomme « enhanceosome ». Ce groupe de protéines facilite les contacts entre les facteurs de transcription et la machinerie transcriptionnelle, favorisant une transcription maximale (Carey, 1998). L'« enhanceosome » peut inclure des co-activateurs comme le p300/CBP (Janknecht and Hunter, 1996) et implique la phosphorylation et l'acétylation d'histones (Ogryzko et al., 1996).

Soulignons rapidement que le rôle de NF-IL-6 (aussi nommé C/EBP pour CCAAT-enhancer binding protein) demeure, à ce jour, mal connu. La famille des C/EBP comporte 6 membres de  $\alpha$  à  $\zeta$  qui sont des facteurs de transcription impliqués dans la différenciation cellulaire, la régulation du cycle cellulaire et l'expression de cytokines (Lekstrom-Himes and Xanthopoulos, 1998).

Chez les cellules non-stimulées, l'expression modeste d'IL-8 reflète probablement des mécanismes de répression génique. Ces derniers impliquent la déacétylation des histones (Ashburner et al., 2001; Wen and Wu, 2001), la liaison de OCT-1 (Wu et al.) et la répression active par le NRF, « NF- $\kappa$ B repressing factor » (Nourbakhsh et al., 2001),

qui se lie au promoteur de l'IL-8 par son élément NRE « negative regulatory element ». En plus des éléments répresseurs de transcription, le faible niveau basal d'IL-8 se trouve également influencé par l'instabilité de son ARNm (Hoffmann et al., 2002). À ce propos, une voie de signalisation impliquant la p38 MAPK est responsable de la stabilisation l'ARNm de l'IL-8. De plus, cette voie implique la MKK6, qui mène à l'activation de la p38 MAPK qui, à son tour, active la MK2 et conduit à la stabilisation de l'ARNm (Winzen et al., 1999).

Pour conclure, il est possible d'établir une association entre l'expression de l'IL-8 et plusieurs pathologies. En effet, les niveaux d'IL-8 sont augmentés dans les lavages bronchoalvéolaires et les expectorations induites de patients asthmatiques, l'asthme sévère plus particulièrement (Gibson et al., 2001; Ordonez et al., 2000), le MPOC (Beeh et al., 2003; Pesci et al., 1998), l'asthme occupationnel (Lemiere et al., 2004) et la fibrose kystique (McGarvey et al., 2002).

## RÉSUMÉ

Puisque les cystéinyl-leucotriènes sont des protagonistes de la pathophysiologie de l'asthme humain et que les neutrophiles sont impliqués dans les cas plus sévères d'asthme, nous avons étudié le potentiel du LTD<sub>4</sub> à induire la synthèse de la chimiokine IL-8 via l'activation du récepteur CysLT1. Tout d'abord, nous avons observé que le LTD<sub>4</sub> induisait la production d'IL-8 chez la lignée monocyttaire THP-1 et chez les cellules dendritiques humaines. De plus, nous avons noté que ces inductions d'IL-8 étaient complètement inhibées par les antagonistes spécifiques du CysLT1. Les cellules HEK293 ont été transfectées de façon stable avec le récepteur CysLT1, afin d'étudier la régulation transcriptionnelle du promoteur de l'IL-8. Nos données démontrent que la transcription et la synthèse d'IL-8 dans ces cellules sont dépendantes du temps de stimulation et de la concentration de LTD<sub>4</sub> utilisée. L'utilisation de différents mutants du promoteur IL-8 comportant des substitutions au niveau des sites putatifs NF-κB, AP-1 et NF-IL-6, révèle la participation de NF-κB et AP-1, mais non de NF-IL-6, dans l'activation du promoteur IL-8 par le LTD<sub>4</sub>. La surexpression du dominant négatif de IκB inhibe la transactivation de l'IL-8 par le LTD<sub>4</sub>. De plus, l'activité de liaison à l'ADN de NF-κB et de AP-1 est induite par le LTD<sub>4</sub>. Le complexe NF-κB en cause est composé de p50 et p65, alors que le complexe AP-1 est formé des protéines c-Jun et c-Fos. Le LTD<sub>4</sub> a également la capacité d'augmenter l'expression de l'ARNm de c-jun et c-fos. Nos résultats démontrent pour la première fois que le LTD<sub>4</sub>, par le biais du récepteur CysLT1, active de façon transcriptionnelle la production d'IL-8, avec l'implication des facteurs de transcription p50, p65, Fos et Jun. Ces découvertes proposent de nouveaux mécanismes potentiellement impliqués dans les processus inflammatoires de l'asthme.

### Contribution de l'étudiant :

En ce qui concerne les travaux contenus dans le premier chapitre de cette thèse, Charles Thompson a contribué activement à l'écriture de cet article sous la supervision de son directeur de thèse. L'étudiant a également réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre à l'exception des travaux présentés à la figure 1C et 1D, réalisés par Maryse Thivierge et les figures 2C, 2D, 5 et 7 réalisées en collaboration avec Alexandre Cloutier.

Il est important de souligner que Christian LeGouill a produit la construction du plasmide pour le récepteur CysLT1 : pCMVintron-cmyc-CysLT1R IRES-hygro.

## **CYSLT1 RECEPTOR ENGAGEMENT INDUCES AP-1- AND NF- $\kappa$ B- DEPENDENT INTERLEUKIN-8 EXPRESSION**

Charles Thompson , Alexandre Cloutier , Ynuk Bossé, Maryse Thivierge, Christian Le Gouill, Pierre Larivée, Patrick P. McDonald, Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski

Immunology Division, Department of Pediatrics, and Pulmonary Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

Corresponding author: Dr. Marek Rola-Pleszczynski, Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3001 North 12th Avenue, Sherbrooke, QC J1H 5N4 Canada, Tel.(819) 346-1110 ext:14851, Fax. (819) 564-5215, e-mail address: [marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca](mailto:marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca)

Running title: LTD<sub>4</sub>-induced IL-8 expression

### **Footnotes**

This work was supported by grants (PPMcD, JS and MRP) and studentships (CT, AC and YB) from the Canadian Institutes of Health Research. PPMcD is a scholar of the Fonds de la recherche en santé du Québec and MRP is the awardee of a Canada Research Chair in Inflammation.



## ABSTRACT

Since cysteinyl-leukotrienes are major protagonists in the pathophysiology of human asthma and since neutrophils are involved in the more severe form of asthma, we studied the potential for leukotriene (LT)<sub>D4</sub> to induce synthesis of the chemokine IL-8 through activation of the CysLT1 receptor. We found LTD<sub>4</sub> to induce IL-8 gene expression in monocytic THP-1 cells and human dendritic cells with complete abrogation by selective CysLT1 antagonists. HEK293 cells stably transfected with CysLT1 were used to better study the transcriptional regulation of the IL-8 promoter. Stimulation of the cells with graded concentrations of LTD<sub>4</sub> resulted in a time- and concentration-dependent induction of IL-8 transcription and protein synthesis. Use of IL-8 promoter mutants with substitutions in their NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL-6 binding elements revealed a requirement for NF- $\kappa$ B and AP-1, but not NF-IL-6, in LTD<sub>4</sub>-induced activation of the IL-8 promoter. Overexpression of dominant negative I $\kappa$ B $\alpha$  inhibited the IL-8 transactivation induced by LTD<sub>4</sub>. NF- $\kappa$ B DNA binding activity was induced by LTD<sub>4</sub> as determined by electrophoretic mobility shift assays and could be supershifted by antibodies against p50 and p65. Supershift assays following LTD<sub>4</sub> stimulation also indicated the formation of a c-Jun/c-Fos complex. Moreover, our results demonstrated that LTD<sub>4</sub> upregulates the expression of c-fos and c-jun at the mRNA level. Our data show for the first time that LTD<sub>4</sub>, via the CysLT1 receptor, can transcriptionally activate IL-8 production, with involvement of the transcription factors p50, p65, Fos and Jun. These findings provide mechanistic and potentially therapeutic elements for modulation of the inflammatory component of asthma.

**Key Words:** Cysteinyl-leukotrienes, signaling, NF- $\kappa$ B, AP-1, Chemokines, Inflammation

## INTRODUCTION

Cysteinyl-leukotrienes, LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub> are potent lipid mediators involved in the pathogenesis of asthma and the resulting pulmonary inflammation. They are mainly released by eosinophils, mast cells and macrophages in the airways (1) and increased levels of leukotrienes have been found in the BAL fluid (2, 3) and sputum (4, 5) of patients with asthma. Cysteinyl-leukotrienes (cysLTs) act on at least two G-protein coupled receptors, CysLT1 and CysLT2 (6, 7). High expression of CysLT1 has been demonstrated in the lung, spleen and peripheral blood leukocytes (6, 8). CysLT1 seems to be responsible for the acute bronchoconstriction effects and mucus hypersecretion induced by cysLTs (9-11). Some evidence also suggests that cysLTs act as chemotactic agents for eosinophils (12). In this regard, the suggested proinflammatory role of cysLTs has been reinforced by the observation that selective CysLT1 antagonists reduce the amount of eosinophil infiltration in the airways (13, 14).

Interleukin (IL)-8, a potent mediator of inflammation, is the prototypical member of the CXC chemokine family. Expression of IL-8 is elevated in BAL fluid and sputum of patients with asthma (15, 16). Additionally, IL-8 is a powerful activator, chemoattractant and survival agent for polymorphonuclear leukocytes (17). Neutrophils are the predominant inflammatory cells in the airways of patients with acute severe asthma (15, 16) and professional asthma (18). Furthermore, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), which is characterized by abnormal inflammatory responses of the airways and lung parenchyma, is associated with airway neutrophilia (19, 20). Airways of COPD patients also contains high levels of IL-8 (20). In addition to neutrophils, IL-8 also activates different subsets of T cells, as well as NK cells and B cells (21). IL-8 gene expression is mainly regulated by three elements, Activator Protein (AP)-1, Nuclear-Factor (NF)- $\kappa$ B and NF-IL-6 present in the IL-8 gene promoter (22). NF- $\kappa$ B is a homo- or heterodimer composed of different members of the Rel family of proteins : NF- $\kappa$ B1 (p50) NF- $\kappa$ B2 (p52), c-Rel, RelA (p65), and RelB (23, 24). The most abundant form of NF- $\kappa$ B heterodimers is composed of p50 and p65 subunits (25). On the other hand, AP-1 is a dimeric transcription factor that includes members of the Jun and

Fos families. Jun family proteins, represented by c-Jun, JunB and JunD, and Fos family proteins, represented by c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2, form homo or heterodimers that bind to the DNA consensus sequence TGAC/GTCA and regulate the activation of different target genes (26, 27). NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors play a pivotal role in the regulation of multiple genes involved in immune and inflammatory responses (25).

Asthma is characterized by chronic inflammation, with infiltration of different leukocytes and high expression of numerous inflammatory proteins in the airways. In severe asthma, both higher levels of cysLTs (28, 29) and increased numbers of neutrophils have been reported (15, 16). We thus hypothesized that LTD<sub>4</sub> could modulate the expression of a chemokine such as IL-8. This would also provide us with the opportunity to study the possible signaling pathways driven by CysLT1. In the present report, we demonstrated that LTD<sub>4</sub> could up-regulate the expression of IL-8 in monocytic cells. Moreover, HEK293 cells stably transfected with CysLT1 also showed modulation of IL-8 production by LTD<sub>4</sub> and served as a model to study CysLT1 signaling. Our results show that modulation of IL-8 expression through the CysLT1 receptor was transcriptional and involved the NF- $\kappa$ B and AP-1 signaling pathways.

## MATERIALS AND METHODS

### *Antibodies and reagents*

Specific antibodies against p-I $\kappa$ B $\alpha$  Ser 32(9241S), p-p65 Ser 536(3031S) were purchased from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) and I $\kappa$ B $\alpha$  (sc-3718), p65 (sc-8008X), p50 (sc-7178X), c-Jun (sc-1694X), c-Fos (sc-52X), JunD (sc-74X), JunB (sc-46X), FosB (sc-48X), CREB1 (sc-240X), CREB2 (sc-200X) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). LTD<sub>4</sub> was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Aprotinin, 4-(2 aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), leupeptin, NaF, soybean trypsin inhibitor, and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada); Hygromycin B (Wisent, St-Bruno, QC, Canada), FuGENE6 were purchased from Roche (Laval, QC, Canada). Montelukast (MK-476) was obtained from Merck Frosst (Pointe-Claire, QC, Canada) and Zafirlukast from AstraZeneca (Lund, Sweden).

### *Plasmids*

pCMVintron-cmyc-CysLT1R IRES-hygro, a bicistronic transcript coding for cmyc-CysLT1R and hygromycin resistance, stabilized by a 5'  $\beta$ -globin intron and under the control of a CMV promoter, was constructed in our laboratory. The dominant negative form of I $\kappa$ B $\alpha$  mutated at serines 32 and 36 were generously provided by Dr Christian Jobin (University of North Carolina at Chapel Hill). pTA-Luc, pNF- $\kappa$ B-TA-Luc and pAP-1-TA-Luc were from Clontech (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). The human IL-8 promoter luciferase constructs IL-8 WT, IL-8 $\Delta$ AP-1, IL-8 $\Delta$ NF- $\kappa$ B and IL-8 $\Delta$ NF-IL-6 were generously provided by Dr Allan R. Brasier from University of Texas Medical Branch (30).

### *Cells*

Immature primary dendritic cells were derived from human peripheral blood mononuclear leukocytes and generated as previously described (31). Human monocytic THP-1 cells (ATCC, Rockville, MD) were cultured in RPMI-1640 medium (Life technologies, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich) Human embryonic

kidney (HEK)293 cells (ATCC) were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium with glucose (Life technologies), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), and gentamicin sulfate (40µg/mL). Transient transfections were carried out with FuGENE 6, and experiments were performed 48h post-transfection.

#### *HEK293 stably expressing CysLT1*

HEK293 cells grown at 50% confluence in 60mm Petri dishes were stably transfected with 4 µg of pCMVintron-cmyc-CysLT1R using 10µL of FuGENE 6. Forty-eight hr following transfections, hygromycin B was added at a final concentration of 300 µg/mL. Cells were then cultured for 2 weeks in medium containing hygromycin B and isolated for clonal selection. Cells clones were analyzed for Myc expression by FACScan flow cytometer \*(BD Bioscience, San Jose, California). Positive clones were maintained in 100 µg/mL hygromycin B. These cells are referred to as 293LT1.

#### *Northern blot analysis*

Total cellular RNA was extracted using TriPure according to the manufacturer's instruction (Roche Diagnostics Canada, Laval, Qc), 15µg of total RNA was separated by electrophoresis on 1% agarose and transferred onto a Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) membrane for Northern analysis. Human IL-8 cDNA probe (0,5 kb *Eco*RI fragment) and human c-Fos cDNA probe were obtained from the American Type Culture Collection (Rockville, MD, USA); human c-Jun probe was kindly provided by Dr Claude Asselin, Université de Sherbrooke. 28S or 18S were used as internal controls. The probes were labeled with a Ready-To-Go DNA Labelling Beads (dCTP) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) using [ $\alpha$ -32P] dCTP (sp. act., 3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were prehybridized for 4 h in a mixture containing 120 mM Tris (pH 7.4), 600 mM NaCl, 8mM EDTA (pH 8), 0.1% sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, and 100 g/ml heparin; hybridization was performed overnight at 71°C (IL-8) or 68°C (c-Fos and c-Jun) in the same mixture in which the concentration of heparin was increased to 625 µg/ml and dextran sulfate at 10% was added. The membranes were then washed once at room temperature for 20 min in 2X SSC (1X SSC: 0.15 M NaCl, 0.15 M sodium citrate (pH 7)) and once with 0.1X SSC.

The membranes were exposed to Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) with intensifying screens -80°C.

#### *Western blot analysis*

293LT1 cells in 6-well plates were incubated in medium without serum for 24 h, stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) for the indicated times, and lysed in buffer: 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% TRITON X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 1 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 10µg/ml soybean trypsin inhibitor, for 30 min on ice. Total lysates were separated on 10% SDS-PAGE, and transferred to Trans-Blot nitrocellulose membrane (BioRad Laboratory, Inc, Hercules, CA). Membranes were blocked with TBS with 5% dry milk for 1 h and incubated with specific antibodies in TBS-0.1% Tween and 5% dry milk overnight at 4°C. After washing and incubation with secondary Abs, an ECL detection system was used for protein detection (Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were stripped by incubation in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, and 10 mM 2-ME for 30 min at 50°C. After washing, membranes were reprobed with the appropriate Abs and developed as described above.

#### *Electrophoretic mobility shift assays*

293LT1 cells were cultured in 6-well plates until nearly confluent; cells were starved overnight. Cells were then stimulated with LTD<sub>4</sub> or EtOH for indicated times and incubations were stopped by adding an equal volume of ice-cold PBS containing 10mM NaF and 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Cells were collected by gentle scraping and centrifuged at 1000 x g for 3 min at 4°C. The resulting cell pellets were resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM HEPES (pH 7.90), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, and 0.5 mM DTT) containing an antiprotease mixture (0.5 mM DFP, 0.5 mM AEBSF, 1 mM PMSF, and 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin A, final concentrations). After a 10-min incubation on ice, an equal volume of lysis buffer containing the antiprotease mixture as well as 0.2% NP-40 was added (to yield a final concentration of 0.1% NP-40). Samples were immediately vortex mixed for 15 s before centrifugation at 1200 x g (5 min at 4°C). The resulting nuclear pellets were washed once

with lysis buffer containing the antiprotease mixture before being resuspended in ice-cold nuclear extraction buffer (20 mM HEPES (pH 7.90), 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 10% (v/v) glycerol) containing the antiprotease mixture. After a 20-min incubation on ice (with frequent mixing), samples were spun (15,000 x g for 15 min at 4°C), and supernatants (the nuclear extracts) were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Extracts were routinely processed for protein content determination. Nuclear extracts (amounts used are specified in the figure legends) were analyzed in EMSA. The sequences of the sense strands of the oligonucleotides used for EMSA were as follows: 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3' (NF-κB), 5'- CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA -3' (AP-1) from Promega (Madison, WI) and 5'- AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C -3' (NF-κB mutant) 5'- CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA -3' (AP-1 mutant) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). For supershift experiments, binding reactions were conducted in the presence of specific antisera to individual c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, CREB1, CREB2 or p65, p50 proteins (30 min at 4°C), before the addition of γ-<sup>32</sup>P-labeled probes. Samples were electrophoresed on 6% acrylamide gels at 4°C in 0.5x TBE; dried gels were then exposed to Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) with intensifying screens at -80°C.

#### *Luciferase assays*

293LT1 cells were plated in 12-well tissue culture plates 24h before transfection and transiently transfected using 1,5 µl of Fugene 6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions, using 0,5 µg of plasmid DNA per well. The day after transfection cells were serum-starved overnight before stimulation with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 6h. Cell lysates were assayed for luciferase activity using the Dual-Glo luciferase system (Promega, Madison, WI).

#### *ELISA*

293LT1 cells were cultured in 12-well culture plates and serum-starved overnight before stimulation with LTD<sub>4</sub> for indicated times and concentrations. Culture supernatants were carefully collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. IL-8

concentrations were determined using the Opt-EIA Human IL-8 ELISA kit (BD Pharmingen, San Diego, CA).

*Statistical analyses*

Where mentioned, statistical significance was assessed using the Student's *t* test for paired data (two-tailed) using PRISM4 software. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$  for  $n \geq 3$ .



## RESULTS

### **LTD<sub>4</sub> induces IL-8 gene expression in monocytic THP-1 cells and human dendritic cells.**

Mononuclear phagocytes readily express the CysLT1 receptor and we have shown the latter to be upregulated by IL-4 and IL-13 (32). Human monocytic THP-1 cells were cultured in the presence of IL-4 (10ng/mL) for 24h before stimulation with LTD<sub>4</sub> or EtOH (as a vehicle control) at graded concentrations for 3h. As shown in Fig 1A, LTD<sub>4</sub> induced a concentration-dependent expression of IL-8 mRNA in THP-1 cells, with a maximal effect at 10 nM of LTD<sub>4</sub>. Moreover, IL-8 expression in response to LTD<sub>4</sub> was totally prevented by pretreatment of the cells with the selective CysLT1 antagonist MK476 (Fig 1B). We recently demonstrated the expression of the CysLT1 receptor on immature dendritic cells (31). Based on this, we studied whether these cells could enhance IL-8 expression in response to LTD<sub>4</sub>. As illustrated in figure 1C, LTD<sub>4</sub> induced a concentration-dependent secretion of IL-8 protein. Involvement of the CysLT1 receptor was confirmed by significant abrogation of IL-8 production in the presence of MK476 (figure 1D). Interestingly, LTB<sub>4</sub> induced a similar induction of IL-8 production in dendritic cells.

These results prompted us to generate easily transfectable cells that expressed only the CysLT1 receptor to study the signaling pathways that lead to induction of IL-8 expression by LTD<sub>4</sub>. We thus produced the stably transfected 293LT1 cells, as described in Materials and Methods.

### **LTD<sub>4</sub> stimulates IL-8 synthesis and release in 293LT1 cells.**

Concentration-response and time-course experiments were conducted to investigate the effect of LTD<sub>4</sub> on IL-8 expression in 293LT1 cells. LTD<sub>4</sub> strongly upregulated IL-8 mRNA at concentrations of 10 and 100 nM (Fig 2A). IL-8 protein production was dependent on the concentration of LTD<sub>4</sub>, as illustrated in figure 2C, with maximum induction at 10 nM of LTD<sub>4</sub> for 8h. Kinetics of IL-8 mRNA expression in response to LTD<sub>4</sub> are shown in figure 2B. Results indicate an increase in IL-8 mRNA within 2h with

a maximum obtained after 4h of stimulation. At 24h, IL-8 mRNA began to decrease, indicating the effect of LTD<sub>4</sub> was rapid, but transient. Furthermore, cells were cultured in the presence of LTD<sub>4</sub> or EtOH for varying lengths of time; culture supernatants were collected, and their IL-8 content was analyzed by ELISA. Figure 2D illustrates the time-dependent IL-8 protein accumulation in response to LTD<sub>4</sub>, starting at 2h and maintained through 24h of LTD<sub>4</sub> stimulation. As expected, selective CysLT1 antagonists (MK476 and Zafirlukast) totally abolished the IL-8 upregulation induced by LTD<sub>4</sub> (data not shown).

#### **LTD<sub>4</sub> induces IL-8 promoter activity in a concentration-dependent manner.**

To determine whether LTD<sub>4</sub> could induce IL-8 transcription, we measured the capacity of LTD<sub>4</sub> to activate the transcription of a luciferase reporter gene driven by the IL-8 promoter (-162/+44). Kinetics of IL-8 promoter activity are shown in figure 3A, indicating a strong induction (up to 100-fold) of IL-8 transactivation using 10 and 100 nM of LTD<sub>4</sub>.

#### **Implication of the NF- $\kappa$ B and AP-1 sites in IL-8 promoter activity stimulated by LTD<sub>4</sub>.**

The IL-8 promoter is well characterized and contains several binding sites for transcription factors, including the AP-1(-126, -120), NF-IL-6 (-94, -81) and NF- $\kappa$ B (-80, -70) sites (33). To determine the implication of each site in the context of LTD<sub>4</sub> stimulation, we used IL-8 promoter constructs containing site-specific mutations (30). As shown in fig 3B, the NF- $\kappa$ B site mutation reduced by 64% the IL-8 promoter activity induced by LTD<sub>4</sub>. Similarly, the AP-1 site mutation inhibited LTD<sub>4</sub>-induced IL-8 promoter activity by 78%. In contrast, mutation of the NF-IL-6 site had no effect. To determine whether these sites are independently inducible by LTD<sub>4</sub>, we measured the capacity of LTD<sub>4</sub> to activate the transcription of a luciferase gene reporter containing tandem copies of consensus sequence of NF- $\kappa$ B or AP-1 elements. As presented in figure 3C, LTD<sub>4</sub> treatment resulted in a 2-fold increase in NF- $\kappa$ B and a 3-fold increase in AP-1 driven luciferase reporter activity indicating independent activation of these elements by cysteinyl-leukotrienes.

#### **Role of NF- $\kappa$ B pathway in the induction of IL-8 promoter activity by LTD<sub>4</sub>.**

Based on the previous results, we investigated which elements of the NF- $\kappa$ B pathway could be activated by LTD<sub>4</sub>. As shown in figure 4A, LTD<sub>4</sub> induced phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  as early as 5 min after stimulation, with persistence until 60 min, and a maximal induction after 15 min. As expected, total I $\kappa$ B $\alpha$  protein was reduced following LTD<sub>4</sub> stimulation, because of the known ubiquitination and proteasomal degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  after its phosphorylation. LTD<sub>4</sub> also stimulated a time-dependent phosphorylation on serine 536 of the p65 NF- $\kappa$ B subunit, with a strong activation 60 minutes following stimulation (fig 4A). To determine whether I $\kappa$ B $\alpha$  phosphorylation was required for LTD<sub>4</sub>-induced IL-8 gene transcription, 293LT1 cells were transfected with a dominant negative form of I $\kappa$ B $\alpha$  along with the IL-8 promoter-luciferase construct and then cultured in presence of LTD<sub>4</sub> for 6h. As shown in fig 4B, overexpression of dominant negative I $\kappa$ B $\alpha$  significantly reduced the IL-8 promoter activity by 54%, following LTD<sub>4</sub> stimulation.

#### **Effect of LTD<sub>4</sub> on NF- $\kappa$ B DNA binding activity.**

Since we saw involvement of the NF- $\kappa$ B pathway, we studied whether NF- $\kappa$ B DNA binding was induced by LTD<sub>4</sub>. As shown in figure 5A, exposure of 293LT1 cells to 10 nM of LTD<sub>4</sub> for graded periods of time resulted in time-dependent induction of NF- $\kappa$ B DNA binding activity, which could be observed within 15 min of stimulation. In order to study the nature of the complex induced by LTD<sub>4</sub>, supershift experiments were performed using specific antibodies. Results in figure 5B indicated that the NF- $\kappa$ B binding complex induced by LTD<sub>4</sub> was composed of p50 and p65.

#### **LTD<sub>4</sub> regulates c-fos and c-jun mRNA expression.**

We also investigated whether LTD<sub>4</sub> stimulation leads to the transcriptional regulation of AP-1 subunits, namely the c-Fos and c-Jun protooncogenes. As shown in figure 6A, LTD<sub>4</sub> induced a rapid and transient expression of c-fos mRNA. Following LTD<sub>4</sub> stimulation, c-fos mRNA was detectable within 15 min, reaching maximal expression at 30 and 45 min and returning to basal levels by 60 minutes. Figure 6B illustrates a similar

pattern of expression for c-jun mRNA following LTD<sub>4</sub> stimulation. Furthermore, kinetics of phosphorylation indicated a strong activation of the c-Jun protein after LTD<sub>4</sub> stimulation (data not illustrated).

**LTD<sub>4</sub> increases AP-1 DNA binding Activity.**

We next examined whether treatment of 293LT1 cells with LTD<sub>4</sub> modulated the AP-1 DNA binding activity. Figure 7A shows the kinetics of AP-1 activation by LTD<sub>4</sub>, indicating a detectable enhancement within 30 min and strong induction at 60 min. Analysis of the binding complex was done after 60 min of stimulation using selected antibodies. As shown in fig 7B, the LTD<sub>4</sub>-inducible complex contained c-Fos and c-Jun, because it could be supershifted using antibodies that recognize specifically these proteins, but not by antibodies to JunB, JunD, FosB, CREB1, CREB2 or by control IgG.

## DISCUSSION

LTD<sub>4</sub> is known to play a major role in the pathogenesis of asthma. Inflammation is an important characteristic of the late phase reaction of asthma and is heralded by cellular infiltration in the lung. At this point, little is known about the mechanism of inflammation orchestrated by cysteinyl-leukotrienes in asthma. Here we report a direct action of LTD<sub>4</sub> on the transcriptional modulation of IL-8 expression. IL-8 is a potent chemoattractant for neutrophils that plays a major role in promoting inflammation, as found in severe asthma (15, 16, 34) and COPD (19, 20). Elevated expression levels of IL-8 have been reported in BAL fluid and sputum of asthmatic patients (15, 16). Our results demonstrate that LTD<sub>4</sub>, acting through the CysLT1 receptor, can induce the expression of IL-8. The effect is time- and concentration-dependent. We also studied the phenomenon in the human monocytic cell line THP-1, in which LTD<sub>4</sub> induced a concentration-dependent expression of IL-8 mRNA. As in the 293LT1 model, nanomolar concentrations of LTD<sub>4</sub> induced the highest levels of IL-8 gene expression. Interestingly, immature dendritic cells also produced increased amounts of IL-8 in response to LTD<sub>4</sub>. Furthermore, the specific CysLT1 antagonist MK476 completely prevented the modulation of IL-8 mRNA in THP-1 and of IL-8 protein in dendritic cells, indicating that the effect induced by LTD<sub>4</sub> was mediated through the CysLT1 receptor. We and others, have previously reported the expression of CysLT1 receptors on leukocytes, including alveolar and monocyte-derived macrophages, as well as dendritic cells and B lymphocytes (6, 8, 31, 32, 35). Moreover, CysLT1 expression levels were upregulated by IL-13 and IL-4 in monocytes and macrophages and the increased CysLT1 receptor expression resulted in enhanced Ca<sup>2+</sup> transients and chemotactic responses to LTD<sub>4</sub> (32).

The functional and clinical relevance of our findings may lie in the interplay between cysLTs, chemokines, neutrophils and eosinophils, as reported in several pathologies. The CysLT1 antagonists Montelukast and Pranlukast were recently shown to prevent neutrophil infiltration in models of ischemia-reperfusion of the kidney (36), sepsis-induced hepatic and ileal injury (37) and brain ischemia (38). Moreover, Montelukast was found to decrease serum and sputum levels of IL-8 and bronchial levels

of eosinophil and neutrophil infiltration in children with cystic fibrosis (39). Interestingly, Kikuchi and colleagues (40) recently demonstrated that IL-8-exposed neutrophils induced eosinophil trans-basement membrane migration.

The signaling mechanisms elicited by CysLT1 are still poorly defined and have not been reported in the context of modulation of IL-8 expression. Our studies initially demonstrated that LTD<sub>4</sub>-induced IL-8 release is transcriptionally regulated, using a reporter gene assay. Based on a well characterized IL-8 promoter sequence, mutation of different binding sites for transcription factors was used to initiate our signaling experiments. The NF- $\kappa$ B site is known as an important factors in the induction of IL-8 gene expression by different pro-inflammatory factor such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (41). Several laboratories have demonstrated that G-protein-coupled receptors (GPCRs) are able to activate the NF- $\kappa$ B pathway. For example, IL-6 expression induced by LTB<sub>4</sub> (42) and MCP-1 released by PAF stimulation (43) are mediated by activation of NF- $\kappa$ B. In this respect, our results showed that NF- $\kappa$ B site mutation reduced the IL-8 promoter activity induced by LTD<sub>4</sub> by 64%. Moreover, the role of AP-1 in the induction of IL-8 gene expression by LTD<sub>4</sub> was demonstrated by a 78% reduction of the promoter activity when the AP-1 transcription site was mutated. Conversely, the NF-IL-6 site, known for its cooperation with NF- $\kappa$ B elements (44, 45), does not appear to be involved in LTD<sub>4</sub>-treated 293LT1 cells, because mutation in the NF-IL-6 site did not affect IL-8 promoter activity. In summary, our data showed that NF- $\kappa$ B and AP-1 were necessary for induction of IL-8 transactivation in response to LTD<sub>4</sub>.

Cell populations which express CysLT1 usually also express CysLT2. Whereas there are selective antagonists for CysLT1, already in clinical use for asthma treatment, there is no selective antagonist for CysLT2 and compound BAY-u9773 is a weak dual antagonist, but also a partial CysLT2 agonist. Transfected cell lines stably expressing only one of the receptors provide a useful tool to dissect selective receptor-mediated signaling mechanisms. As expected, selective antagonists of CysLT1 completely prevented the IL-8 transactivation induced by LTD<sub>4</sub> in 293LT1 cells. Interestingly, recent reports have suggested that Pranlukast and MK-571, two selective CysLT1 antagonists,

could suppress NF- $\kappa$ B activation independently of CysLT1 receptor antagonism (46-48). These reports underscore the interest of using our model, the stably transfected 293LT1 cells, as a tool to specifically study CysLT1 signaling. Moreover, additional genes which are also activated by the same transcription factors following CysLT1 receptor signaling can be identified. In this regard, preliminary results from our laboratory indicate that the chemokine CCL2 (MCP-1), another gene that is regulated in part by NF- $\kappa$ B (49), can also be upregulated by LTD<sub>4</sub> in 293LT1 cells and THP-1 cells (unpublished data).

In resting cells, the NF- $\kappa$ B complex is found in the cytoplasm in an inactive state, bound to the inhibitory protein I $\kappa$ B through association with p65 (RelA) (50). In response to various stimuli, the I $\kappa$ B $\alpha$  subunit is first phosphorylated at serines 32 and 36 by IKK, rapidly polyubiquitinated and degraded through the 26S proteasome, allowing translocation of free NF- $\kappa$ B to the nucleus and subsequent gene activation (51, 52). Our results indicate that the consequence of LTD<sub>4</sub> stimulation was the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  followed by the proteolysis of I $\kappa$ B $\alpha$  protein and simultaneous activation of the p65 NF- $\kappa$ B as demonstrated by phosphorylation on serine 536. This finding is consistent with another report demonstrating the activation of NF- $\kappa$ B p65 in isolated lung monocytes, in a murine model of allergic asthma (53). In our model, overexpression of a dominant negative form of I $\kappa$ B $\alpha$  also suggested the implication of I $\kappa$ B $\alpha$  in the transactivation of IL-8 promoter induced by LTD<sub>4</sub>. NF- $\kappa$ B can be found as a p50 homodimer or, in most cell types, as a heterodimer composed of p65 and p50 (25). Our data show that nuclear factor binding to the NF- $\kappa$ B element was strongly increased in LTD<sub>4</sub>-treated cells, with formation of a complex which included p50 and p65, as indicated by a supershift in EMSA. Interestingly, NF- $\kappa$ B is involved in the expression of a variety of genes controlling immune and inflammatory responses, including early response genes encoding for cytokines, tissue factor and adhesion molecules. Some reports established a correlation between NF- $\kappa$ B pathway activation and asthma exacerbation (54, 55).

We also examined whether AP-1 played a role in the CysLT1 signaling. The transcription factor AP-1 is a target of interest because of its cognate sequence within the

IL-8 promoter known to participate in the transcriptional induction. AP-1 is an heterodimer consisting of members of the Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2) and Jun (c-Jun, JunB, and JunD) families of transcription factors (56). The AP-1 complex is a homodimer of Jun proteins or a heterodimer of Jun and Fos molecules. Regulation of AP-1 activity is critically dependent on the relative proportion of its subunits present in the cells (57). Here we showed for the first time a rapid and transient up-regulation of c-fos and c-jun expression by LTD<sub>4</sub> at the mRNA level. The kinetics of expression of these two transcription factors were similar. AP-1 elements are also regulated at post-translational levels, characterized by phosphorylation of its subunits. We observed a strong phosphorylation of c-Jun, 60 min following LTD<sub>4</sub> stimulation. The protooncogenes c-fos and c-jun are recognized as early-immediate genes, playing a role in cell cycle. C-Jun:c-Jun homodimer complexes or c-Fos:c-Jun heterodimers have been found to regulate the expression of many genes including c-Jun (58) and COX-2 (59). In our studies, supershift assays showed the formation of a c-Fos:c-Jun complex following LTD<sub>4</sub> stimulation. This also constitutes the first demonstration that LTD<sub>4</sub> can induce AP-1 activation and is consistent with the involvement of AP-1 in IL-8 promoter activation.

In summary, we demonstrated that NF- $\kappa$ B and AP-1 play a key role in the signaling driven by the CysLT1 receptor which leads to the induction of IL-8 expression. The current study suggests that LTD<sub>4</sub> not only acts as a direct chemotactic factor, but may also promote the production of IL-8, a chemokine that activates a number of inflammatory cells types. In a broader context, it may be important to consider the potential for LTD<sub>4</sub> to induce the expression of a variety of proinflammatory genes through its ability to activate AP-1 and NF- $\kappa$ B.

### **Acknowledgments**

The authors thank Dr. Allan R. Brasier (U. of Texas) for the IL-8 promoter constructs, Dr Christian Jobin (U. of North Carolina at Chapel Hill) for the dominant negative form of I $\kappa$ B $\alpha$  and Dr Claude Asselin (U. Sherbrooke) for the human c-Jun probe.



## FIGURES LEGENDS

### **Figure 1. Induction of IL-8 gene expression by LTD<sub>4</sub> in THP-1 cells and human dendritic cells.**

THP-1 cells were cultured for 24h in presence of IL-4 (10ng/mL) before addition of LTD<sub>4</sub>. A) Northern blot analysis of IL-8 mRNA expression in THP-1 cells cultured in the presence of graded concentrations of LTD<sub>4</sub> or vehicle (EtOH) for 3h. The 18S RNA expression was used as an internal control. B) Northern blot analysis of IL-8 mRNA expression in THP-1 cells preincubated in the absence or presence of the CysLT1 antagonist MK476 (1  $\mu$ M) and then cultured for 3h in the presence of 10 nM LTD<sub>4</sub> or vehicle (EtOH). Results are representative of two separate experiments. C) Immature monocyte-derived dendritic cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> or EtOH for 24h at indicated concentrations and supernatants were collected to measure IL-8 protein by ELISA. Data are representative of two independent experiments. D) Dendritic cells were also pretreated or not with montelukast (MK476) for 30 min and were then stimulated with LTD<sub>4</sub>, or LTB<sub>4</sub> at indicated concentrations or with vehicle (EtOH) for 24h. Supernatants were collected to measure IL-8 protein by ELISA. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control, \*\* $p < 0.01$  using Student's *t* test,  $n=2$ .

### **Figure 2. LTD<sub>4</sub> induces a concentration- and time-dependent IL-8 synthesis in 293LT1 cells.**

293LT1 cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> or EtOH, A) for 4h at indicated concentrations or B) with 10nM LTD<sub>4</sub> or EtOH for indicated time periods. IL-8 mRNA expression is shown by Northern blot analysis using a specific human IL-8 probe. 293LT1 cells were also separately treated with LTD<sub>4</sub> or EtOH, C) for 8h at indicated concentrations or D) with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for indicated time periods, and supernatants were collected to measure IL-8 protein by ELISA. Data are representative of three independent experiments and are expressed as the means  $\pm$  SEM,  $n=3$ .

**Figure 3. Implication of NF- $\kappa$ B and AP-1 binding sites in IL-8 promoter activity stimulated by LTD<sub>4</sub>.**

A) 293LT1 cells were transiently transfected with 0,5 $\mu$ g/well pOLUC (promoterless vector) or pIL-8-WT promoter constructs. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at indicated concentrations before measurement of luciferase activity. B) 293LT1 cells were transiently transfected with 0,5 $\mu$ g/well pOLUC (promoterless vector), IL-8-WT, IL-8- $\Delta$ NF- $\kappa$ B, IL-8- $\Delta$ AP-1 or IL-8- $\Delta$ NF-IL-6 promoter constructs. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at 10nM before measurement of luciferase activity. B) 293LT1 cells were transfected with the pTA-AP-1-Luc or pTA-NF- $\kappa$ B-Luc promoter constructs containing multimers of AP-1 or NF- $\kappa$ B sites, respectively. Cells were then stimulated with LTD<sub>4</sub> for 6h before luciferase activity measurement. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  or \*\*\* $p < 0.001$  relative to EtOH control cells,  $n=3$ .

**Figure 4. Role of NF- $\kappa$ B pathway in the induction of IL-8 promoter activity by LTD<sub>4</sub>.**

A) 293LT1 cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> or EtOH for indicated time periods. Total proteins were separated by electrophoresis and Western blotted using indicated antibodies. At the bottom of the panel, total p65 protein expression served as internal control. B) Transient transfection of 293LT1 cells with 0,5 $\mu$ g/well pIL-8-WT and pcDNA or dominant negative I $\kappa$ B $\alpha$  construct. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTD<sub>4</sub> at 10nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control, \*\*\* $P < 0.001$ , using Student t-test,  $n=3$ .

**Figure 5. Effect of LTD<sub>4</sub> on the activation of nuclear NF- $\kappa$ B DNA binding activities.**

A) 293LT1 cells were cultured for the indicated times in the presence of LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH before nuclear extraction and EMSA analysis. B) 293LT1 cell were stimulated for 60min prior to nuclear extract preparation. The nuclear extracts were analyzed in EMSA using a radiolabeled consensus NF- $\kappa$ B oligonucleotide probe. The specificity of complex

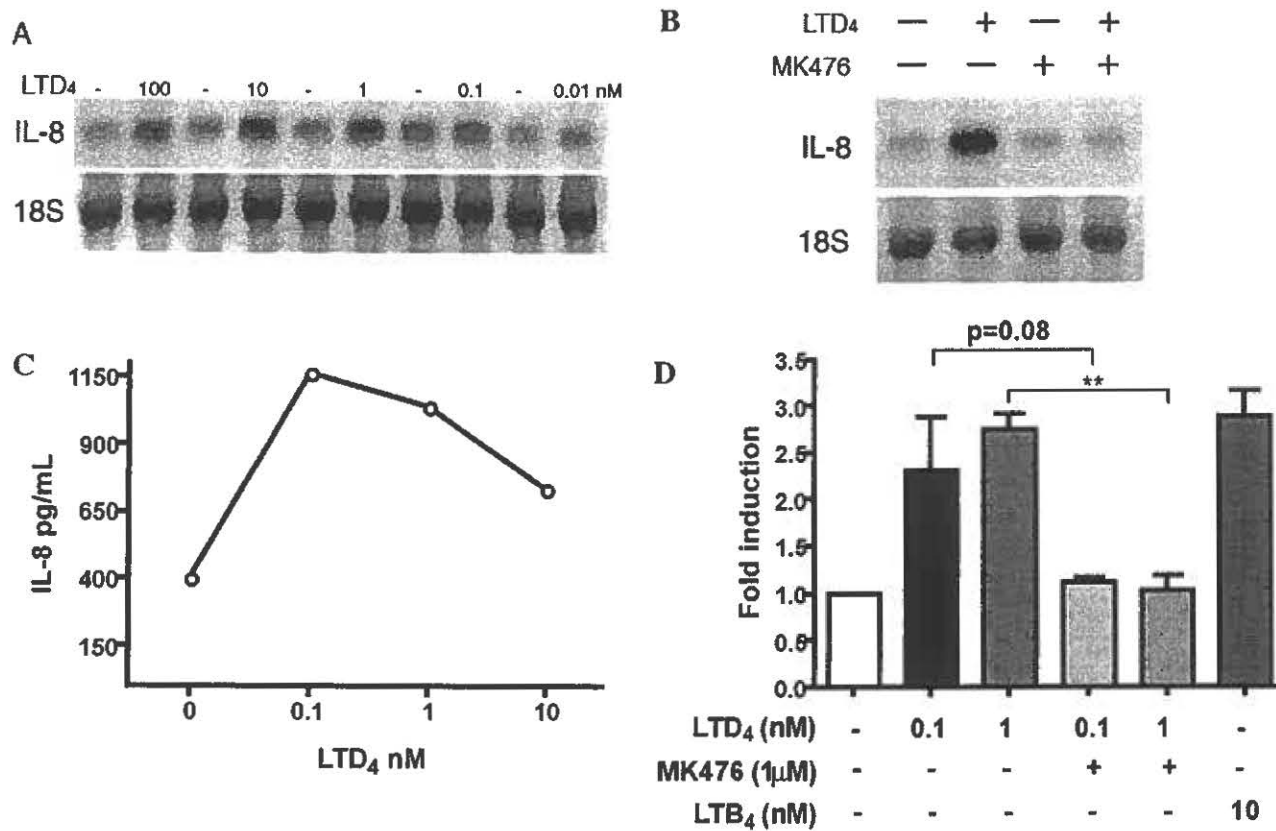
formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold probe, lane 6; or cold mutated probe, lane 7), by including specific anti-p50 (lane 3), anti-p65 (lane 4) or an isotype-matched control antibodies (lane 5).

**Figure 6. LTD<sub>4</sub> up-regulates c-fos and c-jun mRNA expression.**

293LT1 cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> 10nM or EtOH for indicated time periods. Total cellular RNA was then extracted, separated by electrophoresis and Northern blotted using c-fos (A) and c-jun (B) probes. Results are representative of two separate experiments.

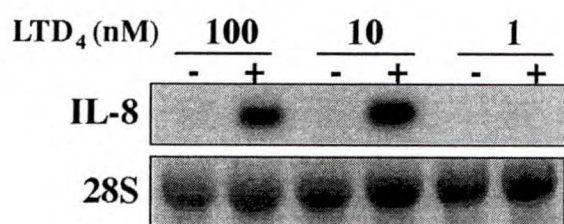
**Figure 7. Analysis of AP-1 binding following LTD<sub>4</sub> stimulation.**

A) 293LT1 cell were cultured in the presence of LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for indicated times prior to nuclear extract preparation. The nuclear extracts were analyzed in EMSA using a radiolabeled consensus AP-1 oligonucleotide probe. B) Cells were stimulated with 10nM LTD<sub>4</sub> or EtOH for 60min before EMSA analysis. The specificity of complex formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold probe, lane 11; or cold mutated probe, lane 12), by including specific anti-c-Jun (lane 3), anti-JunD (lane 4), anti-JunB (lane 5), anti-c-Fos (lane 6), anti-FosB (lane 7), anti-CREB1 (lane 8), anti-CREB2 (lane 9) or an isotype-matched control antibodies (lane 10).

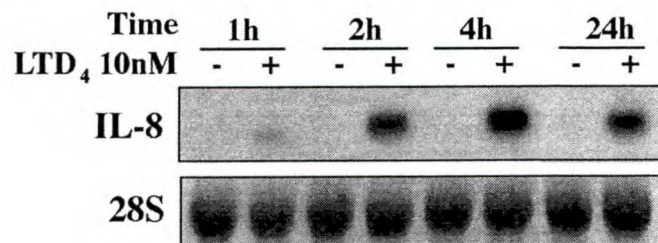


**Figure 1**  
Thompson et al

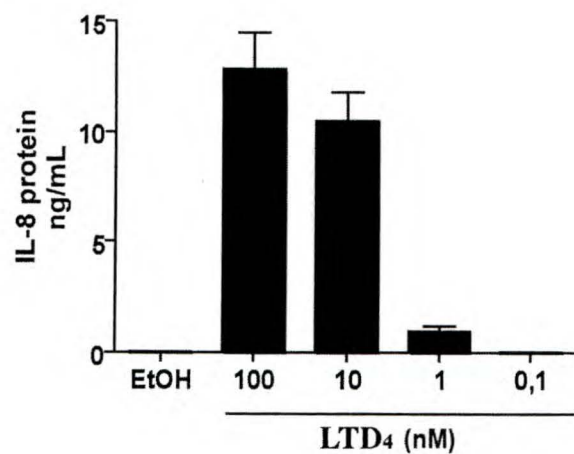
**A**



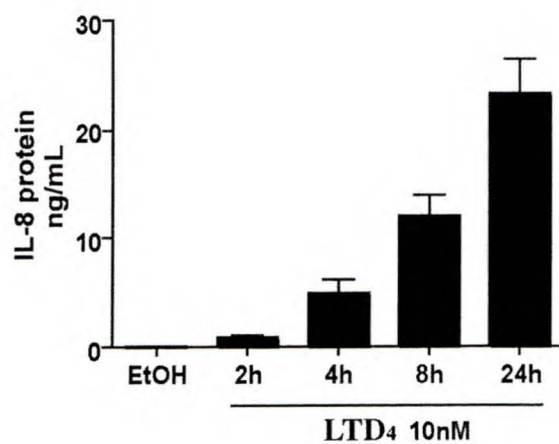
**B**



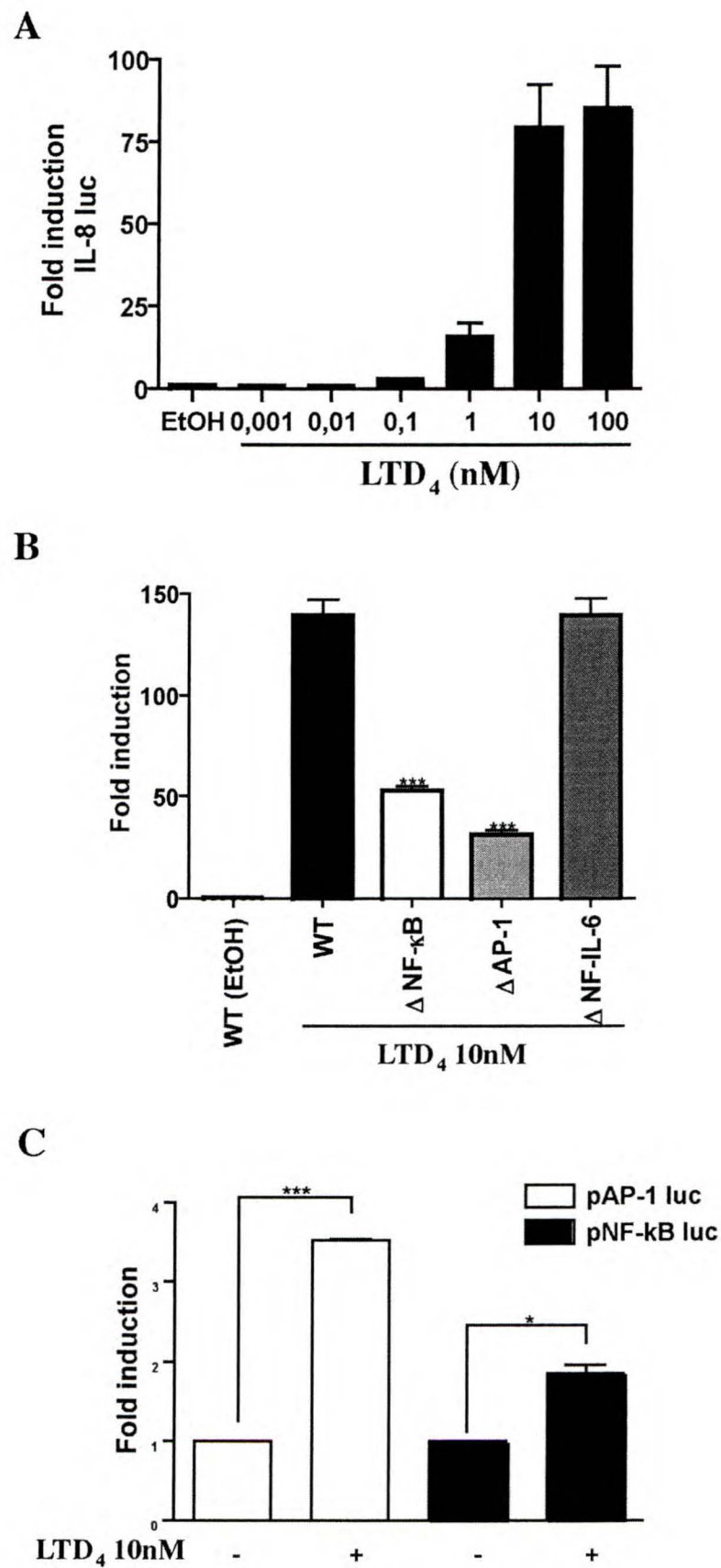
**C**



**D**

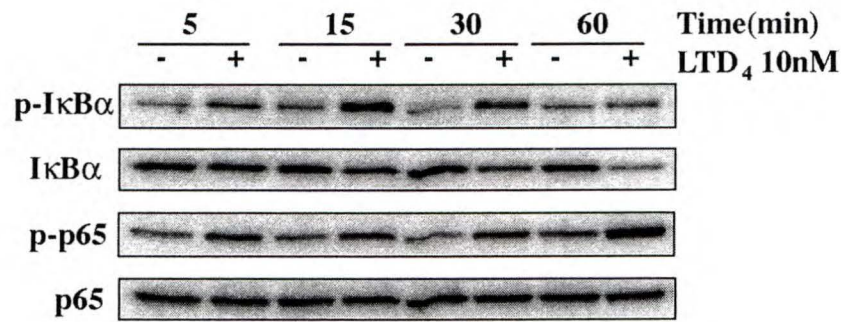


**Figure 2**  
Thompson et al

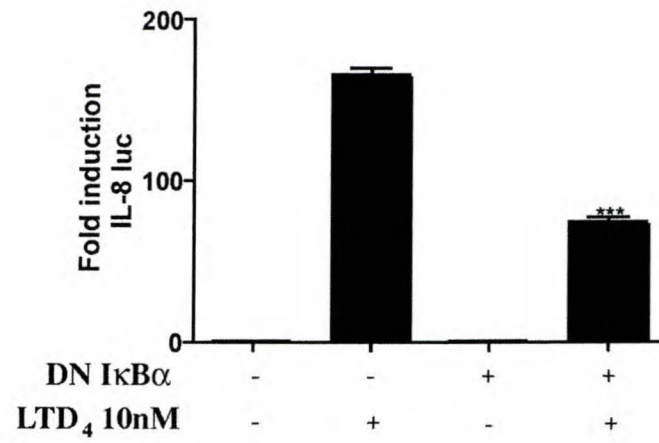


**Figure 3**  
Thompson et al

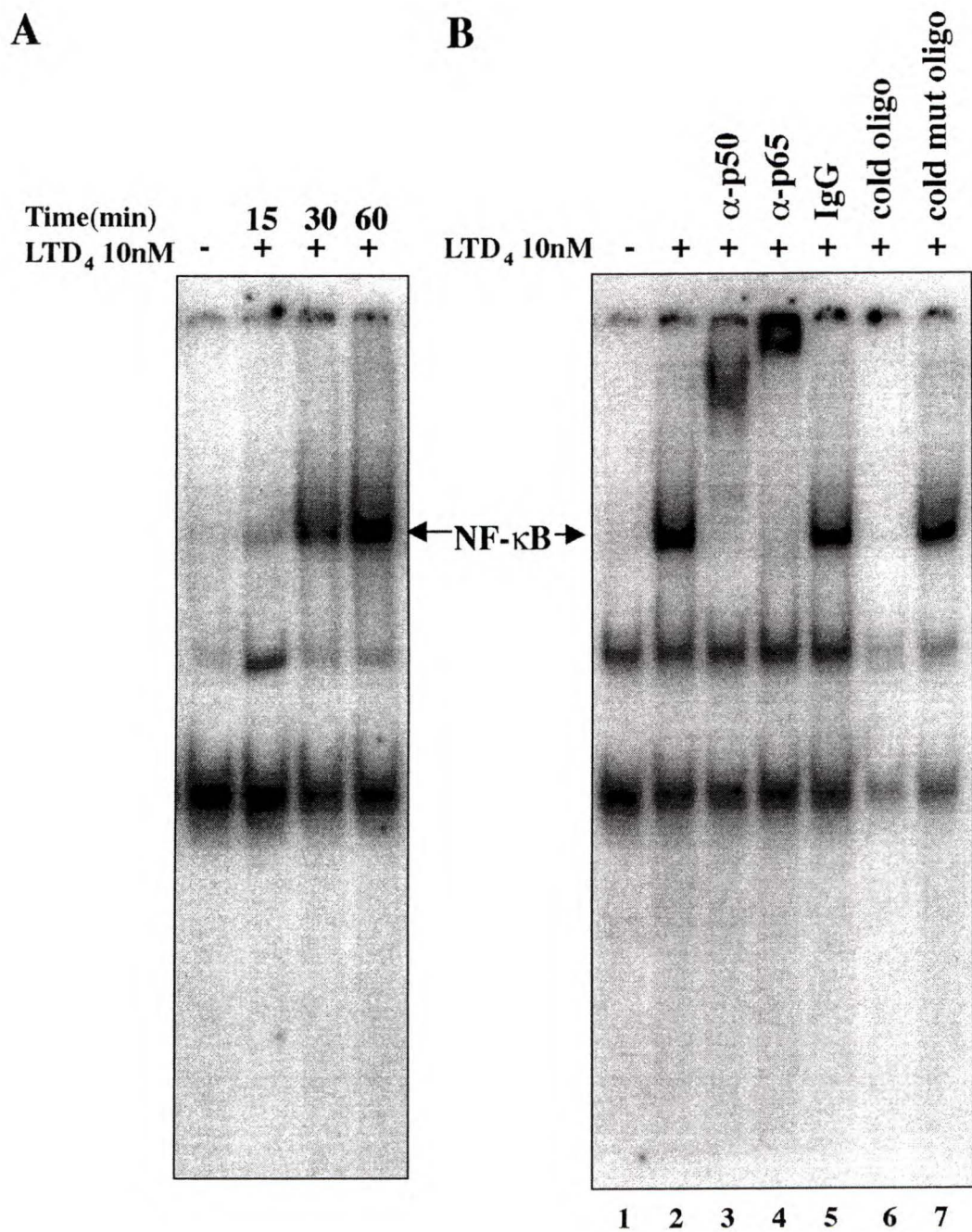
**A**



**B**

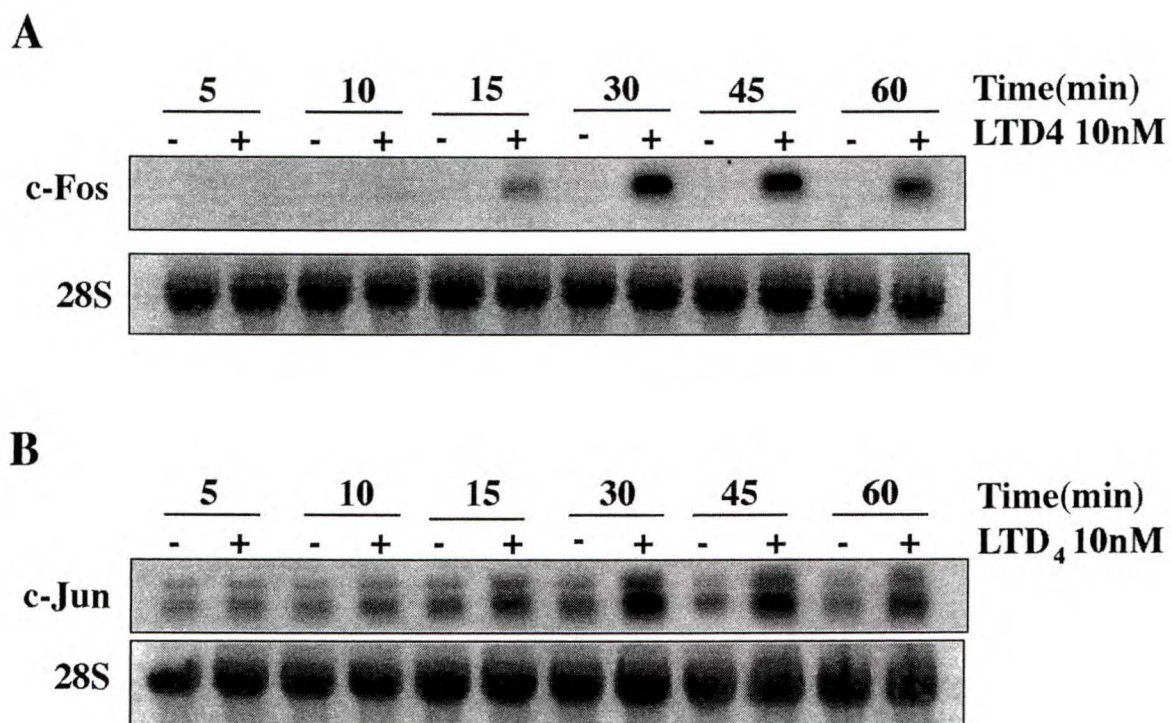


**Figure 4**  
Thompson et al



**Figure 5**  
Thompson et al





**Figure 6**  
Thompson et al

**A**

Time(min)  
LTD<sub>4</sub> 10nM

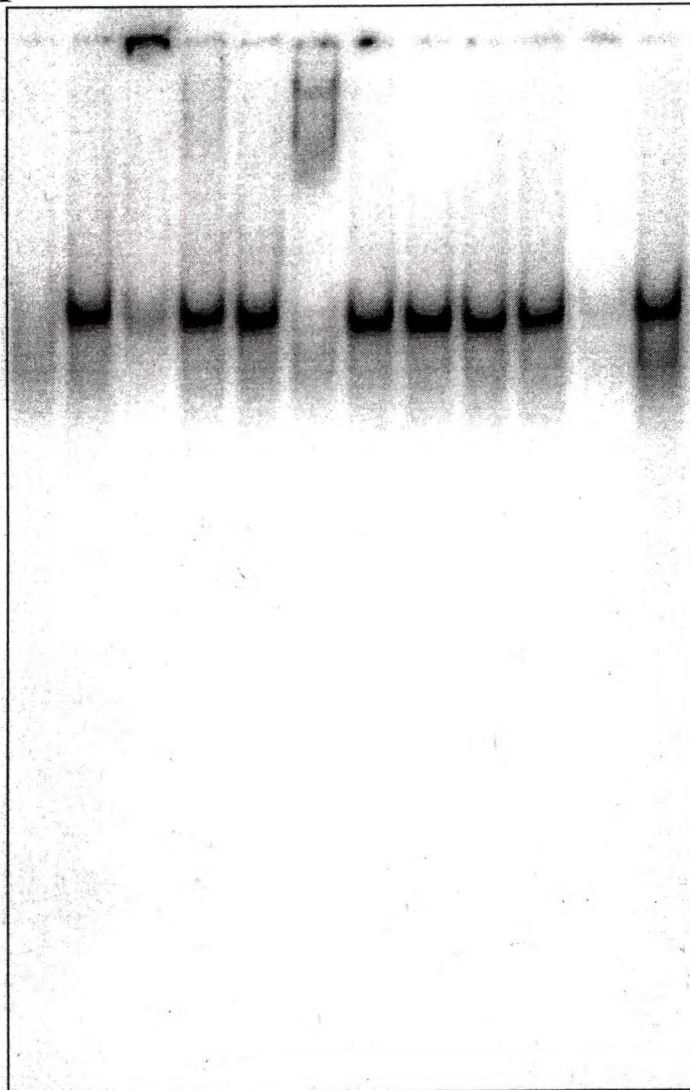
	-	15	30	60
LTD <sub>4</sub> 10nM	-	+	+	+

**B**

LTD<sub>4</sub> 10nM

	-	+	α-c-jun	α-junD	α-junB	α-c-fos	α-fosB	α-CREB1	α-CREB2	IgG	cold oligo	cold mut oligo
LTD <sub>4</sub> 10nM	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+

← AP-1 →



1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12

**Figure 7**  
Thompson et al

## REFERENCES

1. Devillier, P., N. Baccard, and C. Advenier. 1999. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. *Pharmacol Res* 40(1):15-29.
2. Wenzel, S. E., G. L. Larsen, K. Johnston, N. F. Voelkel, and J. Y. Westcott. 1990. Elevated levels of leukotriene C4 in bronchoalveolar lavage fluid from atopic asthmatics after endobronchial allergen challenge. *Am Rev Respir Dis* 142(1):112-9.
3. Lam, S., H. Chan, J. C. LeRiche, M. Chan-Yeung, and H. Salari. 1988. Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol* 81(4):711-7.
4. Macfarlane, A. J., R. Dworski, J. R. Sheller, I. D. Pavord, A. B. Kay, and N. C. Barnes. 2000. Sputum cysteinyl leukotrienes increase 24 hours after allergen inhalation in atopic asthmatics. *Am J Respir Crit Care Med* 161(5):1553-8.
5. Pavord, I. D., R. Ward, G. Woltmann, A. J. Wardlaw, J. R. Sheller, and R. Dworski. 1999. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 160(6):1905-9.
6. Lynch, K. R., G. P. O'Neill, Q. Liu, D. S. Im, N. Sawyer, K. M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D. J. Figueroa, Z. Zeng, B. M. Connolly, C. Bai, C. P. Austin, A. Chateaufneuf, R. Stocco, G. M. Greig, S. Kargman, S. B. Hooks, E. Hosfield, D. L. Williams, Jr., A. W. Ford-Hutchinson, C. T. Caskey, and J. F. Evans. 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature* 399(6738):789-93.
7. Heise, C. E., B. F. O'Dowd, D. J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D. S. Im, R. Stocco, J. N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D. L. Williams, Jr., Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M. K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C. P. Austin, S. R. George, G. P. O'Neill, K. M. Metters, K. R. Lynch, and J. F. Evans. 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275(39):30531-6.
8. Figueroa, D. J., R. M. Breyer, S. K. Defoe, S. Kargman, B. L. Daugherty, K. Waldburger, Q. Liu, M. Clements, Z. Zeng, G. P. O'Neill, T. R. Jones, K. R. Lynch, C. P. Austin, and J. F. Evans. 2001. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in

normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med* 163(1):226-33.

9. Labat, C., J. L. Ortiz, X. Norel, I. Gorenne, J. Verley, T. S. Abram, N. J. Cuthbert, S. R. Tudhope, P. Norman, P. Gardiner, and et al. 1992. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J Pharmacol Exp Ther* 263(2):800-5.
10. Lewis, R. A., K. F. Austen, and R. J. Soberman. 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 323(10):645-55.
11. Drazen, J. M. 1998. Leukotrienes as mediators of airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 3):S193-200.
12. Spada, C. S., A. H. Krauss, A. L. Nieves, and D. F. Woodward. 1997. Effects of leukotrienes B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) and D<sub>4</sub> (LTD<sub>4</sub>) on motility of isolated normodense human eosinophils and neutrophils. *Adv Exp Med Biol* 400B:699-706.
13. Pizzichini, E., J. A. Leff, T. F. Reiss, L. Hendeles, L. P. Boulet, L. X. Wei, A. E. Efthimiadis, J. Zhang, and F. E. Hargreave. 1999. Montelukast reduces airway eosinophilic inflammation in asthma: a randomized, controlled trial. *Eur Respir J* 14(1):12-8.
14. Minoguchi, K., Y. Kohno, H. Minoguchi, N. Kihara, Y. Sano, H. Yasuhara, and M. Adachi. 2002. Reduction of eosinophilic inflammation in the airways of patients with asthma using montelukast. *Chest* 121(3):732-8.
15. Ordonez, C. L., T. E. Shaughnessy, M. A. Matthay, and J. V. Fahy. 2000. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med* 161(4 Pt 1):1185-90.
16. Gibson, P. G., J. L. Simpson, and N. Saltos. 2001. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest* 119(5):1329-36.
17. Harada, A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol* 56(5):559-64.

18. Lemiere, C., S. Pelissier, C. Tremblay, S. Chaboillez, M. Thivierge, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2004. Leukotrienes and isocyanate-induced asthma: a pilot study. *Clin Exp Allergy* 34(11):1684-9.
19. Beeh, K. M., O. Kornmann, R. Buhl, S. V. Culpitt, M. A. Gienbycz, and P. J. Barnes. 2003. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest* 123(4):1240-7.
20. Pesci, A., B. Balbi, M. Majori, G. Cacciani, S. Bertacco, P. Alciato, and C. F. Donner. 1998. Inflammatory cells and mediators in bronchial lavage of patients with chronic obstructive pulmonary disease. *Eur Respir J* 12(2):380-6.
21. Hay, D. W., and H. M. Sarau. 2001. Interleukin-8 receptor antagonists in pulmonary diseases. *Curr Opin Pharmacol* 1(3):242-7.
22. Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol* 72(5):847-55.
23. Zingarelli, B., M. Sheehan, and H. R. Wong. 2003. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med* 31(1 Suppl):S105-11.
24. Hayden, M. S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev* 18(18):2195-224.
25. Senftleben, U., and M. Karin. 2002. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med* 30(1 Suppl):S18-S26.
26. Angel, P., and M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta* 1072(2-3):129-57.
27. Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci* 117(Pt 25):5965-73.
28. Levy, B. D., C. Bonnans, E. S. Silverman, L. J. Palmer, G. Marigowda, and E. Israel. 2005. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172(7):824-30.
29. Green, S. A., M. P. Malice, W. Tanaka, C. A. Tozzi, and T. F. Reiss. 2004. Increase in urinary leukotriene LTE4 levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax* 59(2):100-4.
30. Vlahopoulos, S., I. Boldogh, A. Casola, and A. R. Brasier. 1999. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor

alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94(6):1878-89.

31. Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol* 117(5):1155-62.
32. Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2001. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 167(5):2855-60.
33. Mukaida, N., M. Shiroo, and K. Matsushima. 1989. Genomic structure of the human monocyte-derived neutrophil chemotactic factor IL-8. *J Immunol* 143(4):1366-71.
34. Wenzel, S. E., S. J. Szefler, D. Y. Leung, S. I. Sloan, M. D. Rex, and R. J. Martin. 1997. Bronchoscopic evaluation of severe asthma. Persistent inflammation associated with high dose glucocorticoids. *Am J Respir Crit Care Med* 156(3 Pt 1):737-43.
35. Lamoureux, J., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. Leukotriene D4 enhances immunoglobulin production in CD40-activated human B lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol* 117(4):924-30.
36. Sener, G., O. Sehirli, A. Velioglu-Ogunc, S. Cetinel, N. Gedik, M. Caner, A. Sakarcan, and B. C. Yegen. 2006. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res* 54(1):65-71.
37. Sener, G., O. Sehirli, S. Cetinel, F. Ercan, M. Yuksel, N. Gedik, and B. C. Yegen. 2005. Amelioration of sepsis-induced hepatic and ileal injury in rats by the leukotriene receptor blocker montelukast. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 73(6):453-62.
38. Chu, L. S., E. Q. Wei, G. L. Yu, S. H. Fang, Y. Zhou, M. L. Wang, and W. P. Zhang. 2006. Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in brain after focal cerebral ischemia in mice. *Acta Pharmacol Sin* 27(3):282-8.
39. Schmitt-Grohe, S., and S. Zielen. 2005. Leukotriene receptor antagonists in children with cystic fibrosis lung disease : anti-inflammatory and clinical effects. *Paediatr Drugs* 7(6):353-63.
40. Kikuchi, I., S. Kikuchi, T. Kobayashi, K. Hagiwara, Y. Sakamoto, M. Kanazawa, and M. Nagata. 2006. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol* 34(6):760-5.

41. Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem* 265(34):21128-33.
42. Brach, M. A., S. de Vos, C. Arnold, H. J. Gruss, R. Mertelsmann, and F. Herrmann. 1992. Leukotriene B4 transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NF-kappa B and NF-IL6. *Eur J Immunol* 22(10):2705-11.
43. Weyrich, A. S., T. M. McIntyre, R. P. McEver, S. M. Prescott, and G. A. Zimmerman. 1995. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest* 95(5):2297-303.
44. Stein, B., and A. S. Baldwin, Jr. 1993. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* 13(11):7191-8.
45. Matsusaka, T., K. Fujikawa, Y. Nishio, N. Mukaida, K. Matsushima, T. Kishimoto, and S. Akira. 1993. Transcription factors NF-IL6 and NF-kappa B synergistically activate transcription of the inflammatory cytokines, interleukin 6 and interleukin 8. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(21):10193-7.
46. Ichiyama, T., S. Hasegawa, M. Umeda, K. Terai, T. Matsubara, and S. Furukawa. 2003. Pranlukast inhibits NF-kappa B activation in human monocytes/macrophages and T cells. *Clin Exp Allergy* 33(6):802-7.
47. Tomari, S., H. Matsuse, I. Machida, Y. Kondo, T. Kawano, Y. Obase, C. Fukushima, T. Shimoda, and S. Kohno. 2003. Pranlukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, attenuates allergen-specific tumour necrosis factor alpha production and nuclear factor kappa B nuclear translocation in peripheral blood monocytes from atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy* 33(6):795-801.
48. Ishinaga, H., K. Takeuchi, C. Kishioka, S. Suzuki, C. Basbaum, and Y. Majima. 2005. Pranlukast inhibits NF-kappaB activation and MUC2 gene expression in cultured human epithelial cells. *Pharmacology* 73(2):89-96.
49. Ueda, A., K. Okuda, S. Ohno, A. Shirai, T. Igarashi, K. Matsunaga, J. Fukushima, S. Kawamoto, Y. Ishigatsubo, and T. Okubo. 1994. NF-kappa B and Sp1 regulate

- transcription of the human monocyte chemoattractant protein-1 gene. *J Immunol* 153(5):2052-63.
50. Baeuerle, P. A., and D. Baltimore. 1989. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev* 3(11):1689-98.
  51. Palombella, V. J., O. J. Rando, A. L. Goldberg, and T. Maniatis. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell* 78(5):773-85.
  52. Traenckner, E. B., H. L. Pahl, T. Henkel, K. N. Schmidt, S. Wilk, and P. A. Baeuerle. 1995. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J* 14(12):2876-83.
  53. Kawano, T., H. Matsuse, Y. Kondo, I. Machida, S. Saeki, S. Tomari, K. Mitsuta, Y. Obase, C. Fukushima, T. Shimoda, and S. Kohno. 2003. Cysteinyl leukotrienes induce nuclear factor kappa b activation and RANTES production in a murine model of asthma. *J Allergy Clin Immunol* 112(2):369-74.
  54. Gagliardo, R., P. Chanez, M. Mathieu, A. Bruno, G. Costanzo, C. Gougat, I. Vachier, J. Bousquet, G. Bonsignore, and A. M. Vignola. 2003. Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 168(10):1190-8.
  55. Hart, L. A., V. L. Krishnan, I. M. Adcock, P. J. Barnes, and K. F. Chung. 1998. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 158(5 Pt 1):1585-92.
  56. Kaminska, B., B. Pyrzynska, I. Ciechomska, and M. Wisniewska. 2000. Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60(3):395-402.
  57. Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol* 9(2):240-6.
  58. Angel, P., K. Hattori, T. Smeal, and M. Karin. 1988. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55(5):875-85.
  59. Chen, L. C., B. K. Chen, J. M. Chang, and W. C. Chang. 2004. Essential role of c-Jun induction and coactivator p300 in epidermal growth factor-induced gene expression



of cyclooxygenase-2 in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochim Biophys Acta* 1683(1-3):38-48.

## **CHAPITRE II**

### **Signalisation du récepteur CysLT2 : Implication dans la transcription de chimiokines**

Charles Thompson , Alexandre Cloutier , Ynuk Bossé, Caroline Poisson, Pierre Larivée,  
Patrick P. McDonald, Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski

Article soumis à la revue : *The Journal of Biological Chemistry* en août 2006

## RÉSUMÉ

Les cystéinyl-leucotriènes sont impliqués dans les processus inflammatoires et agissent sur au moins deux récepteurs couplés aux protéines G, soit le CysLT1 et le CysLT2. À ce jour, le rôle et les voies de signalisation du récepteur CysLT2 n'ont pas encore été définis. Nous avons ainsi étudié le potentiel du leucotriène (LT) $C_4$  à induire la production des chimiokines IL-8 et MCP-1, via l'activation du récepteur CysLT2. Nous avons également investigué la signalisation impliquée dans cette activation. Les cellules HEK293 transfectées de façon stable avec le CysLT2 ont été utilisées afin d'étudier la régulation transcriptionnelle du promoteur de l'IL-8. Le LTC $_4$  induit la transcription et l'expression de l'IL-8 de façon dépendante du temps de stimulation et de la concentration de LTC $_4$  employée. L'utilisation de différents mutants du promoteur IL-8 comportant des substitutions au niveau des sites putatifs NF- $\kappa$ B, AP-1 et NF-IL-6, révèle la participation majeure de NF- $\kappa$ B et AP-1, et une implication plus modeste de NF-IL-6, dans l'activation du promoteur IL-8 par le LTC $_4$ . La surexpression du dominant négatif de I $\kappa$ B prévient la transactivation de l'IL-8 par le LTC $_4$ . Le LTC $_4$  augmente également l'activité de liaison à l'ADN de NF- $\kappa$ B et de AP-1, formés respectivement des complexes p50/p65 et c-Jun/ c-Fos. De plus, un pré-traitement avec l'inhibiteur de la PKC $\delta$ , le rottlerin, ou la surexpression du dominant négatif de PKC $\delta$ , inhibent la transcription de l'IL-8 et la phosphorylation de c-Jun induites en réponse au LTC $_4$ . La stimulation de cellules endothéliales humaines, qui expriment exclusivement le CysLT2, par le LTC $_4$ , induit également l'expression d'IL-8 de façon dépendante des PKC. Nos résultats sont novateurs, car aucune publication n'avait révélé jusqu'à aujourd'hui que le LTC $_4$ , via le récepteur CysLT2, pouvait activer transcriptionnellement la production de chimiokines en induisant les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1. Nos observations suggèrent une implication potentielle du récepteur CysLT2 dans la réponse inflammatoire par l'intermédiaire de la modulation des chimiokines.

### Contribution de l'étudiant :

En ce qui concerne les travaux contenus dans le deuxième chapitre de cette thèse, Charles Thompson a contribué activement à l'écriture de cet article sous la supervision de son

directeur de thèse. L'étudiant a également réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre à l'exception des travaux présentés aux figures 1B, 4 et 5 qui ont été réalisés en collaboration avec Alexandre Cloutier et les expériences présentées à la figure 10 qui ont été réalisées par Caroline Poisson.

## **SIGNALING BY THE CYSTEINYL-LEUKOTRIENE RECEPTOR 2 : INVOLVEMENT IN CHEMOKINE GENE TRANSCRIPTION\***

Charles Thompson<sup>a</sup>, Alexandre Cloutier<sup>b</sup>, Ynuk Bossé<sup>a</sup>, Caroline Poisson<sup>a</sup>, Pierre Larivée<sup>b</sup>, Patrick P. McDonald<sup>b</sup>, Jana Stankova<sup>a</sup>, Marek Rola-Pleszczynski<sup>a</sup>

<sup>a</sup> Immunology Division, Department of Pediatrics, and <sup>b</sup> Pulmonary Division, Department of Medicine, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

Running title: CysLT2-mediated chemokine expression

Address correspondence to: Dr. Marek Rola-Pleszczynski, Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3001 North 12th Avenue, Sherbrooke, QC J1H 5N4 Canada, Tel.(819) 346-1110 ext:14851; Fax. (819) 564-5215; E-mail address: [marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca](mailto:marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca)

## ABSTRACT

Cysteinyl-leukotrienes are involved in inflammation and act on at least two G-protein-coupled receptors, CysLT1 and CysLT2. However, the role of the CysLT2 receptor as well as its signaling remain poorly understood. Here we show that leukotriene (LT) $C_4$  induced the production of the chemokine IL-8 in endothelial cells. To further study the signaling cascade involved, HEK293 cells were stably transfected with CysLT2 and used to study the transcriptional regulation of the IL-8 promoter. Stimulation of the cells with increasing concentrations of LTC $_4$  resulted in a time- and concentration-dependent induction of IL-8 transcription and protein synthesis. Use of IL-8 promoter mutants with substitutions in their NF- $\kappa$ B, AP-1 or NF-IL-6 binding elements revealed an almost total requirement for NF- $\kappa$ B and AP-1 elements, and a lesser requirement for the NF-IL-6 element. Overexpression of dominant-negative I $\kappa$ B $\alpha$  prevented the IL-8 transactivation induced by LTC $_4$ . Induction of NF- $\kappa$ B and AP-1 binding following LTC $_4$  stimulation was confirmed by EMSA, and supershift assays indicated the formation of a p50/p65 and a c-Jun/c-Fos complex, respectively. Moreover, pretreatment of the cells with the PKC $\delta$  inhibitor, rottlerin, or transfection with a dominant negative PKC $\delta$  prevented LTC $_4$ -induced IL-8 transcription and c-Jun phosphorylation in response to LTC $_4$ . Our data show for the first time that LTC $_4$  can act via the CysLT2 receptor to transcriptionally activate chemokine production through induction of NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors. These findings suggest the potential implication of CysLT2 in the inflammatory response through the modulation of chemokine gene transcription.

## INTRODUCTION

Cysteinyl-leukotrienes (cysLTs)<sup>1</sup> are lipid mediators implicated in several inflammatory processes, including allergy and asthma. Leukotriene (LT)C<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub> act on two G-protein-coupled receptors (GPCR), CysLT1 and CysLT2 (1-5). Asthmatic patients show increased expression of cysLTs (6-9), mainly produced by eosinophils and mast cells (10). CysLT1 shares 38% homology with CysLT2 and has been shown to promote bronchoconstriction and mucus secretion in response to cysLTs (11-13). Selective antagonists for CysLT1 are in clinical use for the treatment of asthma. Conversely, the function of the CysLT2 receptor is, as yet, poorly defined.

Various reports have suggested a role for CysLT2 in a number of pathologies. The CysLT2 gene is localized on chromosome 13q14, a region linked to atopic asthma (3,14). Interestingly, a coding polymorphism in the CysLT2 receptor, which decreases responsiveness to LTD<sub>4</sub>, has been associated with resistance to asthma (15). Furthermore, another report established an association of a CysLT2 variant with atopy in the Tristan da Cunha population (16). An implication of this receptor in vascular permeability and bleomycin-induced pulmonary fibrosis has been suggested, using CysLT2 receptor-null mice (17). Lotzer and colleagues proposed an involvement of the CysLT2 receptor in inflammation and atherogenesis (18). In this regard, Qiu and colleagues recently demonstrated the upregulation of CysLT2 receptor expression in carotid plaques of mice susceptible to atherosclerosis (ApoE<sup>-/-</sup>) (19).

In humans, distribution of CysLT2 mRNA shows a high expression in peripheral blood leukocytes, adrenals, heart, brain, lymph nodes and spleen (3,4). *In situ* hybridization indicates the expression of CysLT2 receptor in the human lung, specifically in interstitial macrophages (3). Moreover, expression of CysLT2 has been detected on eosinophils, mast cells and mononuclear cells in the upper airways of seasonal allergic rhinitis patients (20). Affinity of cysLTs for the CysLT2 receptor is LTC<sub>4</sub>=LTD<sub>4</sub>>LTE<sub>4</sub>, as demonstrated by binding studies (3,4) and cell populations which express CysLT1 usually coexpress CysLT2. No selective CysLT2 antagonist is available, however, at this time, making this receptor more difficult to study.

Inflammation is characterized by cellular infiltration, orchestrated by a cytokine/chemokine network. IL-8 (or CXCL8) is an important member of the chemokine superfamily, which plays a major role in the recruitment and activation of polymorphonuclear cells, thus promoting inflammation (21). Several pathologies, including severe asthma and chronic obstructive pulmonary disease (COPD), are associated with elevated levels of IL-8 (22-24). Regulation of IL-8 expression usually occurs at the transcriptional level. Its promoter region is well characterized and contains NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL-6 transcription sites (25). NF- $\kappa$ B is involved in the expression of several genes controlling the immune and inflammatory responses (26). NF- $\kappa$ B complexes are dimer combinations of Rel family members composed of NF- $\kappa$ B1(p50), NF- $\kappa$ B2(p52), RelA(p65) and/or c-Rel (27,28). Activator Protein 1 (AP-1) is also a dimeric transcription factor, composed of the Jun (c-Jun, JunB and JunD) and Fos (c-Fos, FosB, Fra1 and Fra-2) families, which regulates the expression of many genes, including IL-8, c-Jun (29) and COX-2 (30). On the other hand, Nuclear Factor IL-6 (NF-IL-6) also named CCAAT enhancer binding protein (C/EBP), is usually characterized as a cofactor, cooperating with other transcription factors such as NF- $\kappa$ B (31-33). The potential for the CysLT2 receptor to induce chemokine production in response to LTC<sub>4</sub> has not been investigated as yet.

Therefore, we hypothesized that LTC<sub>4</sub> could transcriptionally upregulate IL-8 and MCP-1 expression via the CysLT2 receptor. Furthermore, we investigated the signaling events following LTC<sub>4</sub> stimulation, in the context of IL-8 transcription. Here, we provide the first evidence that CysLT2, in response to LTC<sub>4</sub>, activates specific PKC isozymes, as well as the NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors, and that this activation results in chemokine upregulation.



## EXPERIMENTAL PROCEDURES

### *Materials*

LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> were purchased from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). GF109203X and rottlerin was obtained from Biomol Research Laboratory (Plymouth Meeting, PA), and dimethyl sulfoxide (DMSO) was from Fischer Scientific (Montreal, QC, Canada). Specific antibodies against p-IkB $\alpha$  Ser 32/36(9246S), p-p65 Ser 536(3031S), and IkB $\alpha$  (9242) were from Cell Signaling Technology (Beverly, MA) and p65 (sc-8008X), p65 (sc-372), p50 (sc-7178X), p52(sc-298X), c-Rel (sc-70X), c-Jun (sc-1694X), p-c-Jun Ser 63 (sc-822), c-Fos (sc-52X), JunD (sc-74X), JunB (sc-46X), FosB (sc-48X), CREB1 (sc-240X), CREB2 (sc-200X) were obtained from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). Aprotinin, 4-(2 aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), leupeptin, NaF, soybean trypsin inhibitor, and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada); Geneticin (G-418 Sulfate) (Invitrogen Canada Inc, Burlington, ON, Canada) and FuGENE6 were purchased from Roche (Laval, QC, Canada).

### *Plasmids*

The plasmid encoding for IkB $\alpha$  mutated at serines 32 and 36 was generously provided by Dr Christian Jobin (University of North Carolina at Chapel Hill). pCMVintron-cmyc-CysLT2R encoding for cmyc-CysLT2R and geneticin resistance, stabilized by a 5'  $\beta$ -globin intron and under the control of a CMV promoter, was constructed in our laboratory. The human IL-8 promoter luciferase constructs IL-8 WT, IL-8- $\Delta$ AP-1, IL-8- $\Delta$ NF- $\kappa$ B and IL-8- $\Delta$ NF-IL-6 were generously provided by Dr Allan R. Brasier from University of Texas Medical Branch (34). PKC dominant negative constructs (PKC $\beta$ II, PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$  and PKC $\zeta$ ) were a kind gift from Drs Gilles Dupuis and Jean-Guy Lehoux (Université de Sherbrooke).

### *Cells*

Human embryonic kidney (HEK)293 cells (American Type Culture Collection (ATCC), Rockville, MD) were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium with glucose (Life technologies, Burlington, Ontario, Canada), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), and gentamicin sulfate (40 $\mu$ g/mL). Transient transfections were carried out with FuGENE 6, and experiments were performed 48h post-transfection.

#### *HEK293 stably expressing CysLT2.*

HEK293 cells grown at 50% confluence in 60mm Petri dishes were stably transfected with 4 µg of pCMVintron-cmyc-CysLT2R using 10µL of FuGENE 6. Forty-eight hours following transfections, geneticin was added at a final concentration of 800 µg/mL. Cells were then cultured for 2 weeks in medium containing geneticin and isolated for clonal selection. Cell clones were analyzed for Myc expression by FACScan flow cytometer (BD Bioscience, San Jose, California). Positive clones were maintained in 800 µg/mL geneticin and referred to as 293LT2.

#### *HUVEC.*

Umbilical cords were obtained after uneventful deliveries, following informed consent from the mother. Human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were freshly isolated from umbilical veins by collagenase type V digestion as previously described (35). Cells were cultured in Iscove's medium supplemented with FBS (20%), endothelial cell growth supplement (ECGS) (VWR, Ville Mont-Royal, QC, Canada), and antibiotics. Experiments were performed with cell cultures at first passage.

#### *Northern blot analysis*

Total cellular RNA was extracted using TriPure according to the manufacturer's instructions (Roche Diagnostics Canada, Laval, QC), 15µg of total RNA was separated by electrophoresis on 1% agarose and transferred onto a Hybond N<sup>+</sup> (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) membrane. Human IL-8 cDNA probe (0.5 kb *Eco*RI fragment) and human MCP-1 cDNA probe were obtained from the ATCC. 28S or 18S were used as internal controls. The probes were labeled with a Ready-To-Go DNA Labelling Beads (dCTP) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) using [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (sp. act., 3000 Ci/mmol; Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were prehybridized for 4 h in a mixture containing 120 mM Tris (pH 7.4), 600 mM NaCl, 8 mM EDTA (pH 8), 0.1% sodium pyrophosphate, 0.2% SDS, and 100 µg/ml heparin; hybridization was performed overnight at 71°C (IL-8) or 68°C (MCP-1) in the same mixture in which the concentration of heparin was increased to 625 µg/ml and dextran sulfate at 10% was added. The membranes were then washed once at room temperature for 20 min in 2X

SSC (1X SSC: 0.15 M NaCl, 0.15 M sodium citrate (pH 7)) and once with 0.1X SSC. The membranes were exposed to Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) with intensifying screens at -80°C.

#### *Reverse transcription and quantitative PCR reactions*

For reverse transcription, 1mg of total RNA was mixed with 0.5mg of dT oligos (Amersham Biosciences) and 0.5mM dNTPs (Roche) in M-MLV reverse transcription buffer and incubated at 65°C for five minutes. Ten mM DTT (Invitrogen) and 200 U M-MLV Reverse Transcriptase (Promega, Madison, WI).were then added and tubes were incubated at 42°C for 50 minutes, followed by a 70°C incubation for 15 minutes.

For quantitative PCR analysis, 1mL of reverse transcription product was mixed with 5mM of forward primer, 5mM of reverse primer, 0.5U recombinant Taq Polymerase (Amersham Biosciences), 0.25mM dNTP, 1.25mM MgCl<sub>2</sub>, and 1:30000 SYBR green (Molecular Probe, Burlington, ON, Canada) final dilution in supplied Taq buffer, in a final volume of 20mL. PCR reaction started with a 3 minutes hold step at 95°C, followed by 50 times repeat of the cycling step : 15 seconds at 95°C, 20 seconds at 58°C, and 20 seconds at 73°C (acquiring on Fam/Syb) and ended by a melt step rising from 72°C to 95°C. Experiments were performed on RotorGene 3000 PCR machine from Corbett Research (Montreal Biotech Inc., Kirkland, QC, Canada) using Rotor-gene 6 (build 21) software. Data analysis was performed according to the 2<sup>-DDCT</sup> method as previously described {Dussault, 2006 #2; Livak, 2001 #1}. The primer sequences were: GAPDH forward : 5'- GAT GAC ATC AAG AAG GTG GTG AA -3'; GAPDH reverse : 5'- GTG TTA CTC CTT GGA GGC CAT GT -3'; IL-8 forward : 5'- TCT GCA GCT CTG TGT GAA GG -3'; IL-8 reverse : 5'- AGT TTT CCT TGG GGT CCA GA -3' .

#### *Western blot analysis*

293LT2 cells in 6-well plates were incubated in medium without serum for 24 h, stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) for the indicated times, and lysed in buffer: 50 mM Tris (pH 7.5), 1 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 mM NaF, 1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>, 1% TRITON X-100, 0.25% sodium deoxycholate, 1 µg/ml leupeptin, 2 µg/ml aprotinin, 10µg/ml soybean trypsin inhibitor, for 30 min on ice. Total lysates were separated on 10% SDS-PAGE, and transferred to Trans-Blot nitrocellulose

membrane (BioRad Laboratory, Inc, Hercule, CA). Membranes were blocked with TBS with 5% dry milk for 1 h and incubated with specific antibodies in TBS-0.1% Tween and 5% dry milk overnight at 4°C. After washing and incubation with secondary Abs, an ECL detection system was used for protein detection (Amersham Pharmacia Biotech). Membranes were stripped by incubation in 62.5 mM Tris-HCl (pH 6.8), 2% SDS, and 10 mM 2-ME for 30 min at 50°C. After washing, membranes were reprobed with the appropriate Abs and developed as described above.

#### *Electrophoretic mobility shift assays*

293LT2 cells were cultured in 6-well plates until nearly confluent; cells were starved overnight. Cells were then stimulated with LTC<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> or EtOH for indicated times and incubations were stopped by adding an equal volume of ice-cold PBS containing 10mM NaF and 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>. Cells were collected by gentle scraping and centrifuged at 1000 x g for 3 min at 4°C. The resulting cell pellets were resuspended in ice-cold lysis buffer (10 mM HEPES (pH 7.90), 10 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM EGTA, and 0.5 mM DTT) containing an antiprotease mixture (0.5 mM DFP, 0.5 mM AEBSF, 1 mM PMSF, and 10 µg/ml each of aprotinin, leupeptin, and pepstatin A, final concentrations). After a 10-min incubation on ice, an equal volume of lysis buffer containing the antiprotease mixture as well as 0.2% NP-40 was added (to yield a final concentration of 0.1% NP-40). Samples were immediately vortex-mixed for 15 s before centrifugation at 1200 x g (5 min at 4°C). The resulting nuclear pellets were washed once with lysis buffer containing the antiprotease mixture before being resuspended in ice-cold nuclear extraction buffer (20 mM HEPES (pH 7.90), 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM EDTA, 0.5 mM DTT, and 10% (v/v) glycerol) containing the antiprotease mixture. After a 20-min incubation on ice (with frequent mixing), samples were spun (15,000 x g for 15 min at 4°C), and supernatants (the nuclear extracts) were snap-frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C. Extracts were routinely processed for protein content determination. The sequences of the sense strands of the oligonucleotides used for EMSA were as follows: 5'- AGT TGA GGG GAC TTT CCC AGG C -3' (NF-κB), 5'- CGC TTG ATG AGT CAG CCG GAA -3' (AP-1) from Promega (Madison, WI) and 5'- AGT TGA GGC GAC TTT CCC AGG C -3' (NF-κB mutant) 5'- CGC TTG ATG ACT TGG CCG GAA -3' (AP-1 mutant) from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). For supershift experiments, binding reactions were conducted in the presence of specific antisera to individual c-Jun, JunB, JunD, c-Fos, FosB, CREB1, CREB2 or p65, p50,

p52, c-Rel proteins (30 min at 4°C), before the addition of  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-labeled probes. Samples were electrophoresed on 6% acrylamide gels at 4°C in 0.5x TBE; dried gels were then exposed to Hyperfilm MP (Amersham Pharmacia Biotech) with intensifying screens at -80°C.

#### *Luciferase assays*

293LT2 cells were plated in 12-well tissue culture plates 24h before transfection with 0.5 µg of plasmid DNA per well, using 1.5 µl of Eugene 6 transfection reagent (Roche) according to the manufacturer's instructions. The day after transfection, cells were serum-starved overnight before stimulation with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 6h. Cell lysates were assayed for luciferase activity as previously described {Thompson 2006}.

#### *ELISA*

293LT2 cells were cultured in 12-well culture plates and serum-starved overnight before stimulation with LTC<sub>4</sub> for indicated times. Cell-free culture supernatants were carefully collected, snap-frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C. IL-8 concentrations were determined using the Opt-EIA Human IL-8 ELISA kit (BD Pharmingen, San Diego, CA).

#### *Statistical analyses*

Where mentioned, statistical significance was assessed using the Student's *t* test for paired data (one-tailed) using PRISM4 software (GraphPad Software Inc, San Diego, CA). Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### *LTC<sub>4</sub> regulates IL-8 and MCP-1 expression in 293LT2 cells.*

Since several primary cell types express both CysLT2 and CysLT1 receptors and because of a lack of selective CysLT2 antagonists, we generated a cell line that stably expresses only the CysLT2 receptor, referred to as 293LT2 cells, as described in Materials and Methods. This provided a useful tool to selectively study the signaling pathways downstream of the CysLT2 receptor. Time-course experiments were conducted to elucidate the effects of LTC<sub>4</sub> on IL-8 and MCP-1 expression in 293LT2 cells. As shown in figure 1A, LTC<sub>4</sub> induced IL-8 mRNA expression within 1h of stimulation, with a maximum after 8h. The effect of LTC<sub>4</sub> on IL-8 mRNA was rapid, but transient, as demonstrated by a reduced expression after 24h of stimulation. Kinetics of MCP-1 mRNA expression in response to LTC<sub>4</sub> are shown in the middle panel of figure 1A. Increased IL-8 protein expression in response to LTC<sub>4</sub> was also time-dependent, starting at 2h and maintained through 24h of LTC<sub>4</sub> stimulation (Fig 1B).

### *LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> induce IL-8 promoter activity in a concentration-dependent manner.*

To determine whether LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 gene expression occurs at the transcriptional level, 293LT2 cells were transfected with a luciferase reporter gene driven by the IL-8 promoter and the promoter activity was measured following stimulation with LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub>. As shown in figure 2A, LTC<sub>4</sub> strongly upregulated IL-8 transactivation in a concentration-dependent manner, with a maximal effect at 200nM of LTC<sub>4</sub> for 6h. LTD<sub>4</sub> also induced IL-8 transactivation, with 200nM giving the highest induction (figure 2A). Interestingly, LTC<sub>4</sub> was almost 10-fold more potent in inducing IL-8 promoter activity than LTD<sub>4</sub>, at suboptimal concentrations. IL-8 promoter activity in response to cysLT stimulation was not induced in untransfected HEK293 cells (data not shown).

### *LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 promoter activity is dependent on NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL-6 sites.*

In order to determine the transcription factor binding sites involved in the induction of IL-8 transactivation in response to LTC<sub>4</sub>, site-specific mutants of the 5'flanking region of the IL-8 gene were used (34). As shown in figure 2B, the NF- $\kappa$ B site mutation reduced drastically (by 90%) the IL-8 promoter activity induced by LTC<sub>4</sub>. Mutation within the AP-1 site resulted in a

75% reduction of the LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 transactivation, whereas the NF-IL-6 site mutation caused only a 40% reduction.

*Activation of different NF-κB pathway elements in response to LTC<sub>4</sub>.*

Since we observed the involvement of NF-κB, we addressed the elements of this pathway which could be activated by LTC<sub>4</sub>. Figure 3A illustrates the induction of IκBα phosphorylation following LTC<sub>4</sub> stimulation with a maximal induction after 15min. As also shown in figure 3A (top panel), LTC<sub>4</sub> induced a time-dependent phosphorylation of the p65 NF-κB subunit, on serine 536. In order to assess whether IκBα activation was required for LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 promoter transactivation, 293LT2 cells were cotransfected with a dominant-negative form of IκBα and the IL-8-luc reporter construct and then stimulated with LTC<sub>4</sub>. As illustrated in figure 3B, overexpression of dominant-negative IκBα inhibited IL-8 promoter activity by 90% in response to LTC<sub>4</sub>.

*LTC<sub>4</sub> increases NF-κB DNA binding activity.*

Based on the above results, we investigated whether LTC<sub>4</sub> could up-regulate NF-κB DNA binding. Figure 4A illustrates the kinetics of LTC<sub>4</sub>-induced NF-κB DNA binding, indicating an induction which could be seen within 15 min of stimulation. As seen above (Figure 2A), LTC<sub>4</sub> was also a better agonist than LTD<sub>4</sub> in inducing NF-κB binding (Figure 4A). Analysis of the DNA binding complex following LTC<sub>4</sub> stimulation was performed using specific antibodies. Supershift experiments indicated that the NF-κB binding complex contained p50 and p65 subunits (Figure 4B).

*LTC<sub>4</sub> stimulates the DNA binding of AP-1.*

We also investigated whether LTC<sub>4</sub> stimulation of the 293LT2 cells could modulate AP-1 DNA binding activity. As shown in figure 5A, 293LT2 cells exposed to 20nM of LTC<sub>4</sub> for indicated periods of time showed a time-dependent induction of AP-1 DNA binding activity, which was evident at 60 min. Figure 5A also indicates a stronger induction of AP-1 DNA binding activity by LTC<sub>4</sub> than by LTD<sub>4</sub>. Supershift experiments showed that the AP-1 binding complex was composed of c-Jun and c-Fos proteins (Fig 5B).

*LTC<sub>4</sub> induces the phosphorylation of c-Jun independently of JNK.*

Phosphorylation of c-Jun is necessary for full activation of the AP-1 complex. Since we observed the involvement of the c-Jun/c-Fos complex in stimulated 293LT2 cells, we next assessed whether c-Jun could be phosphorylated following stimulation with LTC<sub>4</sub>. As shown in figure 6A, LTC<sub>4</sub> induced a marked phosphorylation of c-Jun. C-Jun N-Terminal Kinases (JNK) are a well characterized enzyme usually responsible for c-Jun phosphorylation. We thus assessed whether SP600125, a specific JNK inhibitor, could inhibit LTC<sub>4</sub>-induced c-Jun phosphorylation. As illustrated in figure 6A, graded concentrations of the JNK inhibitor did not prevent c-Jun phosphorylation induced by LTC<sub>4</sub>, even at 20μM of SP600125. The efficacy of the JNK inhibitor was confirmed, however, by its capacity to inhibit JNK phosphorylation induced by LTC<sub>4</sub> (Fig 6B). SP600125 was also unable to prevent LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 transactivation, as shown in Figure 6C. Interestingly, LTC<sub>4</sub> thus appears to be an inducer of JNK activation, but this enzyme is not involved in LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 expression.

*Protein Kinase C is important in CysLT2-mediated IL-8 transactivation.*

Since JNK was not involved in LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 expression, we investigated whether PKC could play a role in AP-1-dependent IL-8 transactivation. Pretreatment of 293LT2 cells with the broad-spectrum PKC inhibitor, GF109203X, or the PKCδ-specific inhibitor, rottlerin, significantly abrogated LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 promoter activation (figure 7A). Furthermore, as illustrated in figure 7B, specific dominant-negative constructs for PKCδ, PKCε and PKCζ also reduced LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 transactivation, thus suggesting their implication in LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 gene transcription. In contrast, the dominant-negative PKCβII construct only had a minor impact on LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 transcription (Figure 7B).

*PKCδ is required for LTC<sub>4</sub>-induced AP-1 pathway activation and IL-8 transactivation.*

Interestingly, LTC<sub>4</sub>-induced phosphorylation of c-Jun was inhibited by rottlerin, (Fig 8A), suggesting that PKCδ was required for c-Jun activation. This was also reflected in LTC<sub>4</sub>-induced AP-1 DNA binding (Fig 8C), with inhibition with rottlerin and GF109203X, but not with the JNK inhibitor SP600125. Furthermore, GF109203X, but not rottlerin prevented LTC<sub>4</sub>-induced phosphorylation of JNK (Fig 8B).



*Involvement of PKC in LTC<sub>4</sub>-mediated NF-κB activation.*

LTC<sub>4</sub> was found to phosphorylate p65 in a CysLT2-dependent manner, but without involvement of PKCδ, as shown in figure 9A. However, inhibition of LTC<sub>4</sub>-induced p65 phosphorylation by GF109203X suggested that another PKC isozyme may be involved. This was also observed in LTC<sub>4</sub>-induced NF-κB DNA binding (Fig 9B).

*LTC<sub>4</sub> induces IL-8 gene expression in human endothelial cells.*

HUVEC readily express the CysLT2 receptor, with very low expression of CysLT1. The effects of cysLTs on HUVEC have been shown to be the consequence of CysLT2 activation, since specific CysLT1 antagonists do not prevent cysLT stimulation (18). As shown in figure 10A, LTC<sub>4</sub> induced a time-dependent expression of IL-8 mRNA in HUVEC, with maximal effects observed following 2h of LTC<sub>4</sub> stimulation. This was not prevented by pretreatment with the CysLT1 receptor antagonist montelukast (data not illustrated). Furthermore, as shown in figure 10B, pretreatment of HUVEC with the broad-spectrum PKC inhibitor, GF109203X, completely abrogated LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 transcription.

## DISCUSSION

Cysteinyl-leukotrienes are lipid mediators with a proinflammatory profile and have been implicated in the pathogenesis of several types of inflammation. The role of the CysLT1 receptor is being extensively investigated and characterized. Conversely, the mechanisms responsible for inflammation driven by the CysLT2 receptor have not been reported as yet. This may be due, in part, to the fact that many cell types express both CysLT2 and CysLT1 receptors and to the lack of selective antagonists for CysLT2.

In the present study, we demonstrate that LTC<sub>4</sub>, acting through the CysLT2 receptor, can directly activate the production of the chemokines IL-8 and MCP-1. These are potent mediators of inflammation and play key roles in the recruitment and activation of several immune cell populations. High levels of IL-8 have been reported in several pathologies, including severe asthma and chronic obstructive lung disease (COPD) (22-24). Our results indicate that LTC<sub>4</sub> induces a time-dependent expression of IL-8 at both the mRNA and protein levels and also induces a concentration-dependent transactivation of the IL-8 promoter. Interestingly, although LTC<sub>4</sub> and LTD<sub>4</sub> have equal binding affinity for CysLT2 (3,4), we found LTC<sub>4</sub> to be ~10-fold more potent than LTD<sub>4</sub> for CysLT2 receptor activation.

A major aim of this work was to investigate the signaling pathways that could be activated via the CysLT2 receptor. NF- $\kappa$ B is a powerful transcription factor involved in the activation of many inflammatory genes, including the IL-8 gene, following stimulation by LPS or proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  (36). NF- $\kappa$ B has also been reported to be activated by G-protein-coupled receptor (GPCR) signaling (37,38). Our data show that a mutation in the NF- $\kappa$ B site within the IL-8 reporter construct reduced the IL-8 promoter activity induced by LTC<sub>4</sub> in 293LT2 cells by 90%, indicating a major role for the NF- $\kappa$ B transcription factor in CysLT2 signaling.

In unstimulated cells, the NF- $\kappa$ B complex is maintained in an inactive form by the binding of p65 to its inhibitory factor I $\kappa$ B $\alpha$  (39). Following activation, IKK phosphorylates I $\kappa$ B $\alpha$  on serines 32 and 36, leading to rapid polyubiquitination and degradation of I $\kappa$ B $\alpha$  in the

proteasome (40,41). Free p65 subunits can then translocate to the nucleus and activate gene transcription. Our results demonstrate that LTC<sub>4</sub> can induce the phosphorylation of IκBα, in a time-dependent manner, with a maximal induction at 15 min. Furthermore, LTC<sub>4</sub> is also able to stimulate the phosphorylation of p65 at serine 536. Our data show as well that expression of a dominant-negative form of IκBα in 293LT2 cells abrogates by 90% LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 promoter transactivation, indicating a major role for IκBα in CysLT2 receptor signaling. NF-κB is a homo or heterodimer composed of different combinations of Rel family members. We determined by supershift assays that LTC<sub>4</sub> induced the formation of a functional p50/p65 NF-κB complex.

Interestingly, AP-1 was also implicated in CysLT2 receptor signaling. AP-1 responsive elements are part of many gene promoters, including IL-8 (34), COX-2 (30) and c-Jun (29). We initially demonstrated that an AP-1 site mutation decreased by 75% the IL-8 promoter activity stimulated by LTC<sub>4</sub>. Next we showed that LTC<sub>4</sub> strongly induced DNA binding of AP-1. Furthermore, our results provided the first evidence that LTC<sub>4</sub> induces the formation of a functional c-Jun/c-Fos complex. The AP-1 complex can be regulated by a post-translational phosphorylation, which can influence the stability of its members, its transactivating potential and its DNA-binding capacity (42). Here we showed a strong phosphorylation of c-Jun, following 60 min of LTC<sub>4</sub> stimulation. Interestingly, although LTC<sub>4</sub> stimulation also resulted in phosphorylation of JNK, which is usually responsible for c-Jun phosphorylation, inhibition of JNK activity neither affected c-Jun phosphorylation nor LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 promoter transactivation. Accordingly, results from our laboratory also indicate that phosphorylation of other members of the MAPK family, namely p38 and Erk, occurs in response to LTC<sub>4</sub> despite their lack of implication in IL-8 transactivation (unpublished data).

We studied whether protein kinase C (PKC) could be an upstream element of the CysLT2 signaling leading to IL-8 transactivation. PKCs are serine/threonine kinases which play a role in several signaling pathways implicated in cell proliferation, apoptosis and gene activation (43,44). The PKC family is divided into three classes of isoenzymes, the conventional PKC isoforms α, βI, βII and γ regulated by Ca<sup>2+</sup> and diacylglycerol (DAG), the novel PKC isoforms δ, ε, η and θ dependent on DAG but not on Ca<sup>2+</sup> and the atypical PKC isoforms ι, λ and ζ which are both

Ca<sup>2+</sup>- and DAG-independent. Several reports indicate that PKC is an upstream effector of NF-κB activating pathways leading to chemokine secretion (45,46). Studies by Thodeti and colleagues indicate that LTD<sub>4</sub> can activate PKCα, δ and ε, but not βII, in intestinal epithelial cells, a mechanism triggered by the CysLT1 receptor (47). Our results demonstrate an implication of PKCs in IL-8 transactivation, based on GF109203X, a broad PKC inhibitor, and rottlerin, a selective PKCδ inhibitor. We also found PKCδ to be an upstream element of the AP-1 pathway, since rottlerin pretreatment abrogated c-jun phosphorylation and AP-1 DNA binding. Interestingly, rottlerin did not affect the NF-κB pathway, in terms of p65 phosphorylation and NF-κB DNA binding. Conversely, in other GPCR signaling, PKCδ was reported to mediate lysophosphatidic acid- and substance P-induced NF-κB activation (45,46).

Upstream element(s) affecting the NF-κB pathway following CysLT2 receptor stimulation remain to be elucidated. However, our results suggest that they involve the participation of PKCs, because GF109203X was able to inhibit NF-κB pathway activation by LTC<sub>4</sub>. PKCε and PKCζ appear as good candidates, since the dominant-negative forms of these PKCs inhibited IL-8 transactivation following LTC<sub>4</sub> stimulation. In this regard, a recent study indicates that PKCε is required for fMLP-induced activation of NF-κB (48). Several reports also suggest that PKCζ is involved in the activation of NF-κB pathway. Moreover, overexpression of PKCζ in NIH-3T3 fibroblasts provoked a permanent translocation of active NF-κB into the nucleus (49). Indeed, PKCζ has been shown to phosphorylate the p65 subunit and IKKβ (50-52).

Finally, we demonstrated the induction of IL-8 transcripts by LTC<sub>4</sub> in primary human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), which was not prevented by the CysLT1 antagonist montelukast, but was abrogated by PKC inhibition. Lotzer and colleagues reported that HUVEC predominantly expressed a functional CysLT2 receptor, rather than CysLT1, as evidenced by a calcium flux in response to LTD<sub>4</sub> that was not blocked by CysLT1 antagonists (18). Moreover, HUVEC express high levels of CysLT2 mRNA, but very few transcripts of CysLT1 receptor (53). During the preparation of this manuscript, Uzonyi and colleagues reported that CysLT2 and protease-activated receptor 1 can activate early genes, including IL-8, in endothelial cells (54). Our results corroborate and extend these data. Indeed, the major findings of the present study are

the definition of some of the signaling pathways induced by the CysLT2 receptor, which had not been reported as yet.

In summary, we provide evidence for a major involvement of the transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1 in CysLT2 receptor signaling that leads to chemokine gene activation. Figure 11 summarizes the CysLT2 signaling cascade that we found in this study. Taken together, our data suggest the potential for the CysLT2 receptor to induce additional proinflammatory genes, via its capacity to activate NF- $\kappa$ B and AP-1 transcription factors.

## FOOTNOTES

\* The authors thank Dr. Allan R. Brasier (U. of Texas) for the IL-8 promoter constructs and Dr Christian Jobin (U. of North Carolina at Chapel Hill) for the dominant negative form of I $\kappa$ B $\alpha$ . PKC dominant negative constructs were a kind gift from Drs Gilles Dupuis and Jean-Guy Lehoux (Université de Sherbrooke). This work was supported by grants (PPMcD, JS and MR-P) and studentships (CT, AC and YB) from the Canadian Institutes of Health Research. MR-P is the recipient of a Canada Research Chair in Inflammation.

<sup>1</sup>The abbreviations used are : CysLT, Cysteinyl-leukotriene; LTC<sub>4</sub>, leukotriene C<sub>4</sub>; LTD<sub>4</sub>, leukotriene D<sub>4</sub>; LTE<sub>4</sub>, leukotriene E<sub>4</sub>; IL-8, interleukine-8; MCP-1, monocyte chemotactic protein 1; COX-2, cyclooxygenase 2; GPCR, G-protein-coupled receptor; HEK293, Human embryonic kidney 293; COPD, chronic obstructive pulmonary disease.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1 : LTC<sub>4</sub> induces a time-dependent IL-8 and MCP-1 synthesis in 293LT2 cells.** A) 293LT2 cells were stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for indicated times. IL-8 and MCP-1 mRNA expression is shown by Northern blot analysis using a specific human IL-8 and MCP-1 probe. Data are representative of three independent experiments. B) 293LT2 cells were treated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH at indicated times and supernatants were collected to measure IL-8 protein by ELISA. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM; n=3.

**Figure 2 : CysLTs increase IL-8 promoter activity : Implication of NF- $\kappa$ B, AP-1 and NF-IL-6 binding sites.** A) 293LT2 cells were transiently transfected with 0.5 $\mu$ g/well pOLUC (promoterless vector) or pIL-8-WT promoter constructs. Cells were incubated for 6h with EtOH, LTC<sub>4</sub> or LTD<sub>4</sub> at indicated concentrations before measurement of luciferase activity. B) 293LT2 cells were transiently transfected with 0.5 $\mu$ g/well pOLUC (promoterless vector), IL-8-WT, IL-8- $\Delta$ NF- $\kappa$ B, IL-8- $\Delta$ AP-1 or IL-8- $\Delta$ NF-IL-6 promoter constructs. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTC<sub>4</sub> at 20nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control. \*\*\*p< 0.001 relative to wild-type control, using Student's t-test; n=3.

**Figure 3 : Role of the NF- $\kappa$ B pathway in the induction of IL-8 promoter activity by LTC<sub>4</sub>.** A) 293LT2 cells were stimulated with LTC<sub>4</sub> or EtOH for indicated times. Total proteins were separated by electrophoresis and Western blots were performed using indicated antibodies. At the bottom of the panel, total p65 protein expression served as internal control. B) Transient transfection of 293LT2 cells with 0.5 $\mu$ g/well pIL-8-WT and pcDNA or dominant negative I $\kappa$ B $\alpha$  construct. Cells were incubated for 6h with EtOH or LTC<sub>4</sub> at 20nM before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control, \*\*\*p< 0.001 relative to pcDNA-transfected cells stimulated with LTC<sub>4</sub> using Student's t-test; n=3.

**Figure 4 : Analysis of NF- $\kappa$ B binding following LTC<sub>4</sub> stimulation.** A) 293LT2 cells were cultured for the indicated times in the presence of LTC<sub>4</sub> (20nM), LTD<sub>4</sub> (20nM) or EtOH before nuclear extraction and EMSA analysis. B) 293LT2 cells were stimulated with LTC<sub>4</sub> for 60 min

prior to nuclear extract preparation. Nuclear extracts were analyzed by EMSA using a consensus NF- $\kappa$ B oligonucleotide radiolabeled probe. The specificity of complex formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold probe, lane 8; or cold mutated probe, lane 9), by including specific anti-p50 (lane 3), anti-p52 (lane 4), anti-p65 (lane 5) or anti-c-Rel (lane 6) antibodies or an isotype-matched control antibody (lane 7). Experiments were performed 3 times and representative data are shown.

**Figure 5 : LTC<sub>4</sub> up-regulates AP-1 DNA binding activities.** A) 293LT2 cell were cultured in presence of LTC<sub>4</sub> (20nM), LTD<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for indicated times prior to nuclear extract preparation. Nuclear extracts were analyzed in EMSA using a consensus AP-1 oligonucleotide radiolabeled probe. B) Cells were stimulated with 20nM of LTC<sub>4</sub> or EtOH for 60min before EMSA analysis. The specificity of complex formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold probe, lane 11; or cold mutated probe, lane 12), by including specific anti-c-Jun (lane 3), anti-JunD (lane 4), anti-JunB (lane 5), anti-c-Fos (lane 6), anti-FosB (lane 7), anti-CREB1 (lane 8) or anti-CREB2 (lane 9) antibodies or an isotype-matched control antibody (lane 10). Experiments were performed 3 times, and representative data are shown.

**Figure 6: JNK is not involved in LTC<sub>4</sub>-induced c-Jun phosphorylation.** 293LT2 cells were pretreated or not with SP600125 at 1, 10 or 20 $\mu$ M in A) or 20 $\mu$ M in B) for 30 min followed by stimulation with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 60 min. Total proteins were separated by electrophoresis and Western blots were performed using indicated antibodies. Total p65 or JNK protein expression served as internal control. Results are representative of 3 separate experiments. C) Cells were pretreated or not with SP600125 (10 $\mu$ M or 20 $\mu$ M) for 30 min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 6h before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control; n=3.

**Figure 7: PKC regulates LTC<sub>4</sub>-induced IL-8 transactivation.** A) 293LT2 cells were pretreated or not with rottlerin (10 $\mu$ M), GF109203X (2 $\mu$ M) or DMSO (vehicle) for 30min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 6h before measurement of luciferase activity. B) Transient transfection of 293LT2 cells with 0.5 $\mu$ g/well pIL-8-WT and pcDNA or dominant negative PKC $\beta$ , PKC $\delta$ , PKC $\epsilon$ , and PKC $\zeta$  constructs. Cells were incubated for 6h with

EtOH or LTC<sub>4</sub> (20nM) before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control, \*\*p< 0.01 or \*\*\*p< 0.001 relative to DMSO in A and mock-transfected cells in B using Student's t-test; n=3.

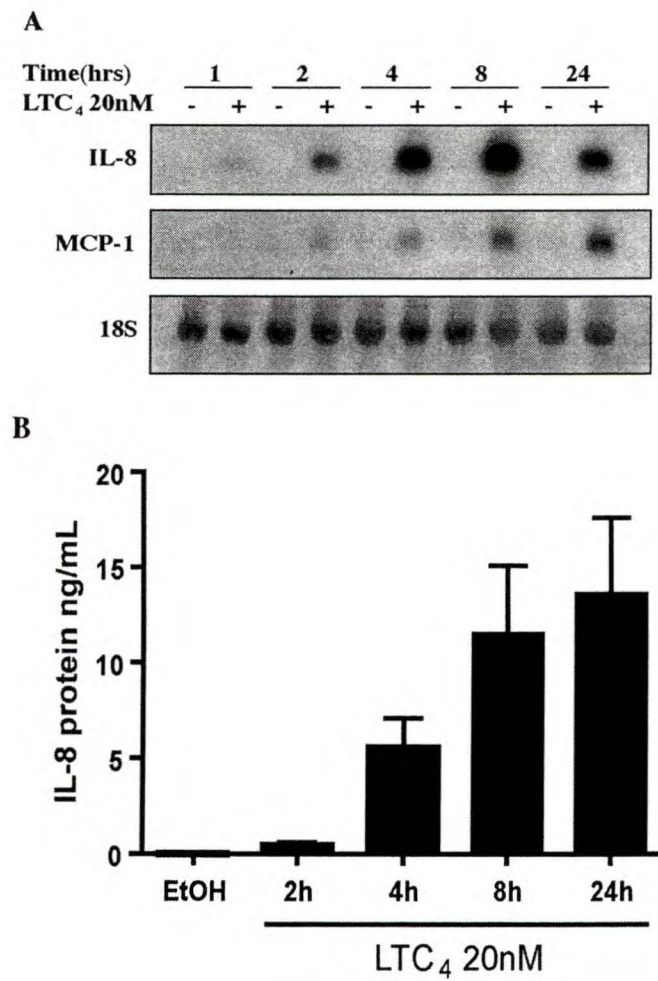
**Figure 8: PKC $\delta$  is involved in LTC<sub>4</sub>-induced activation of the AP-1 pathway.** A) 293LT2 cells were pretreated or not with rottlerin (5 $\mu$ M and 10 $\mu$ M) for 30 min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 60 min for phosphorylation of c-Jun.. Total proteins were separated by electrophoresis and Western blots were performed using indicated antibodies. B) 293LT2 cells were pretreated or not with rottlerin (10 $\mu$ M) or GF109203X (2 $\mu$ M) for 30 min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 30 min to analyze phosphorylation of JNK. Total proteins were separated by electrophoresis and Western blots were performed using indicated antibody. C) 293LT2 cells were pretreated with rottlerin (10 $\mu$ M), GF109203X (2 $\mu$ M) or SP600125 (20 $\mu$ M) for 30min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 60 min prior to nuclear extract preparation. The nuclear extracts were analyzed by EMSA using a consensus AP-1 oligonucleotide radiolabeled probe.

**Figure 9: LTC<sub>4</sub>-induced NF- $\kappa$ B pathway is abrogated by PKC inhibitors.** A) 293LT2 cells were pretreated or not with GF109203X (2 $\mu$ M) or rottlerin (10 $\mu$ M) for 30min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (20nM) or EtOH for 15min to analyse phosphorylation of p65. Total proteins were separated by electrophoresis and Western blotted using indicated antibodies. B) 293LT2 cells were pretreated or not with GF109203X (2 $\mu$ M), rottlerin (10 $\mu$ M) or SP600125 (20 $\mu$ M) for 30min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> 20nM or EtOH for 60min prior to nuclear extract preparation. The nuclear extracts were analyzed in EMSA using a consensus NF- $\kappa$ B oligonucleotide radiolabeled probe.

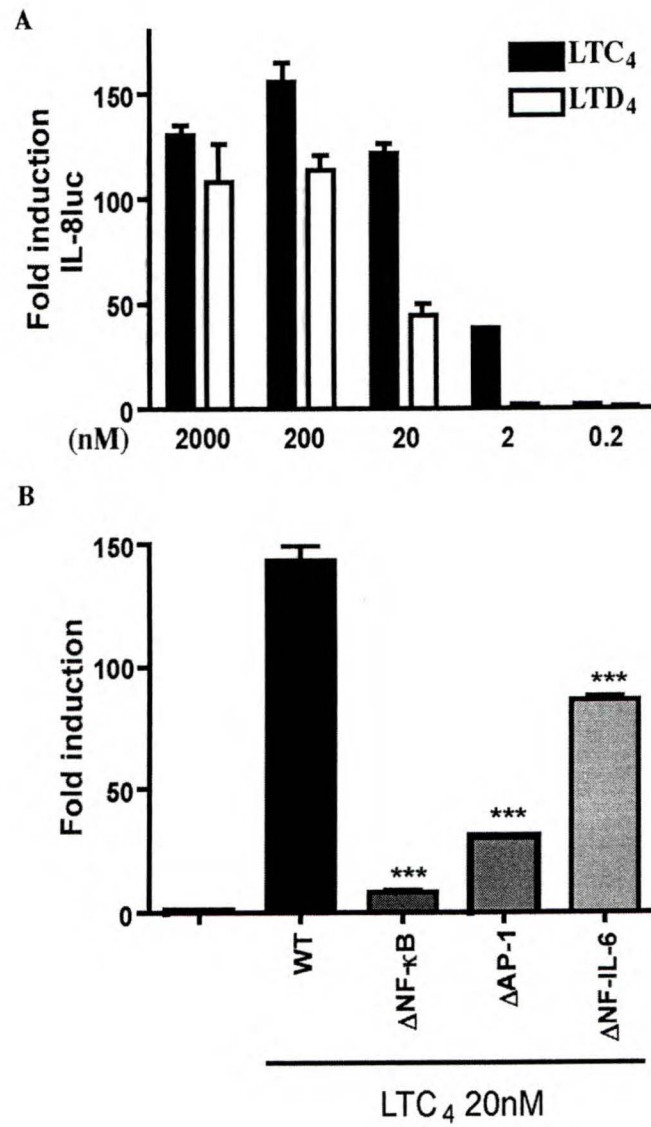
**Figure 10: LTC<sub>4</sub> induces a time-dependent expression of IL-8 mRNA in HUVEC.** A) HUVEC were treated with LTC<sub>4</sub> (200nM) or ethanol at indicated times. Quantification of IL-8 mRNA levels was performed by real-time PCR. Data are expressed as fold increase relative to housekeeping gene GAPDH  $\pm$  SEM; n=3. B) HUVEC were pretreated or not with GF109203X (2 $\mu$ M) for 30min and were then stimulated with LTC<sub>4</sub> (200nM) or EtOH for 2h. Quantifications were performed as in A.



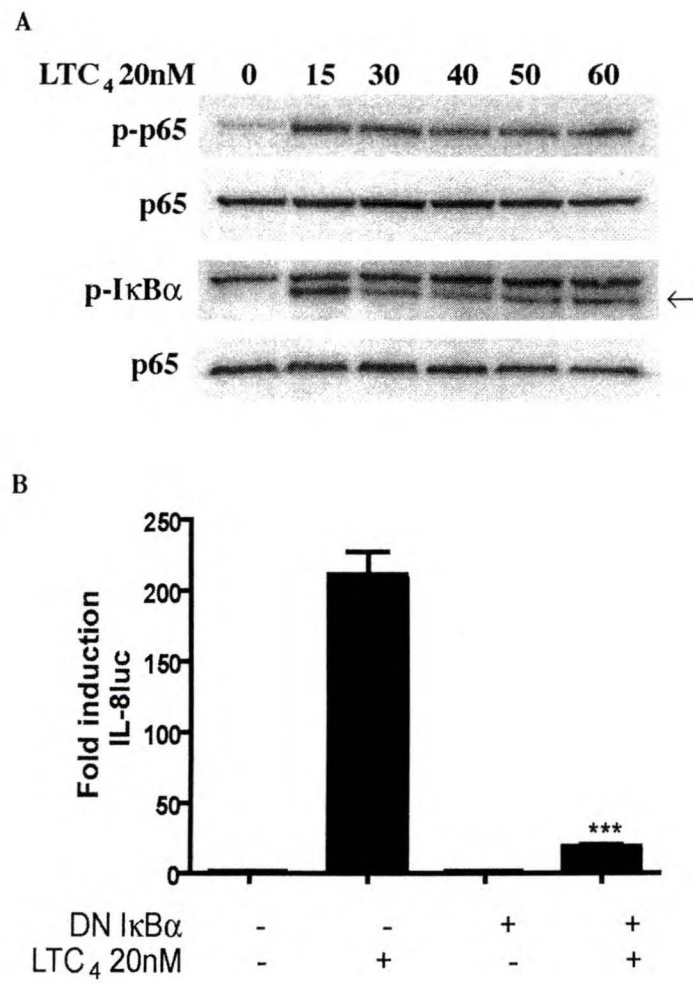
**Figure 11: Schematic representation of CysLT2 signaling mechanisms involved in LTC<sub>4</sub>-induced chemokine production.** LTC<sub>4</sub> binding to the CysLT2 receptor results in activation of the AP-1 and NF- $\kappa$ B pathways, involving PKC family kinases. LTC<sub>4</sub> induces an AP-1 complex composed of c-Jun and c-Fos, which binds to the TRE (AP-1) site to induce chemokine transcription. AP-1 pathway activation can be abrogated by Rottlerin, a PKC $\delta$  inhibitor. LTC<sub>4</sub> also induces the phosphorylation of I $\kappa$ B $\alpha$  and p65, and activates an NF- $\kappa$ B complex formed by p50/p65 subunits, which also participates in chemokine gene transcription. Dashed arrows represent hypothetical pathways and GF =GF109203X.



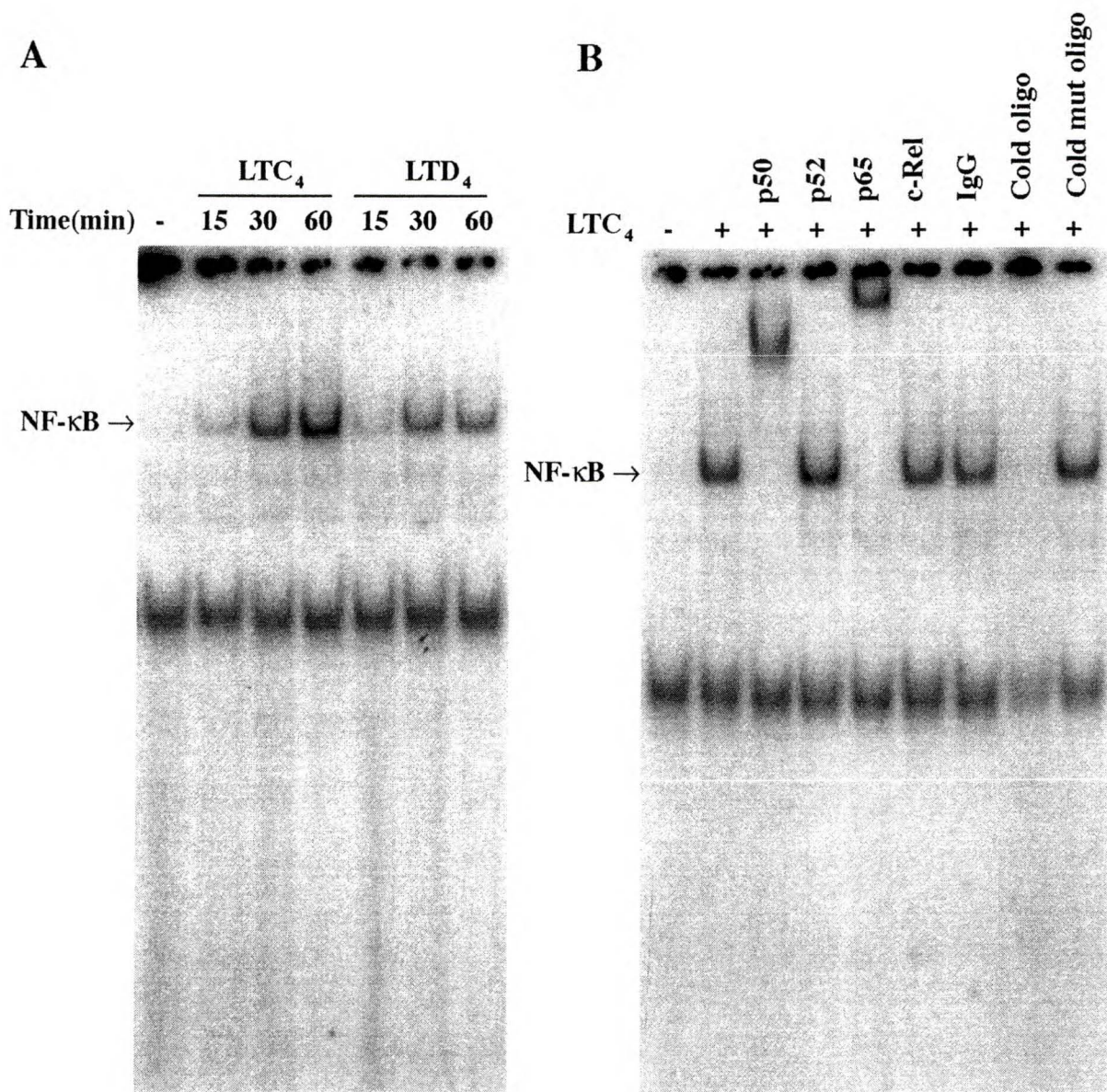
**Figure 1**  
Thompson et al



**Figure 2**  
Thompson et al

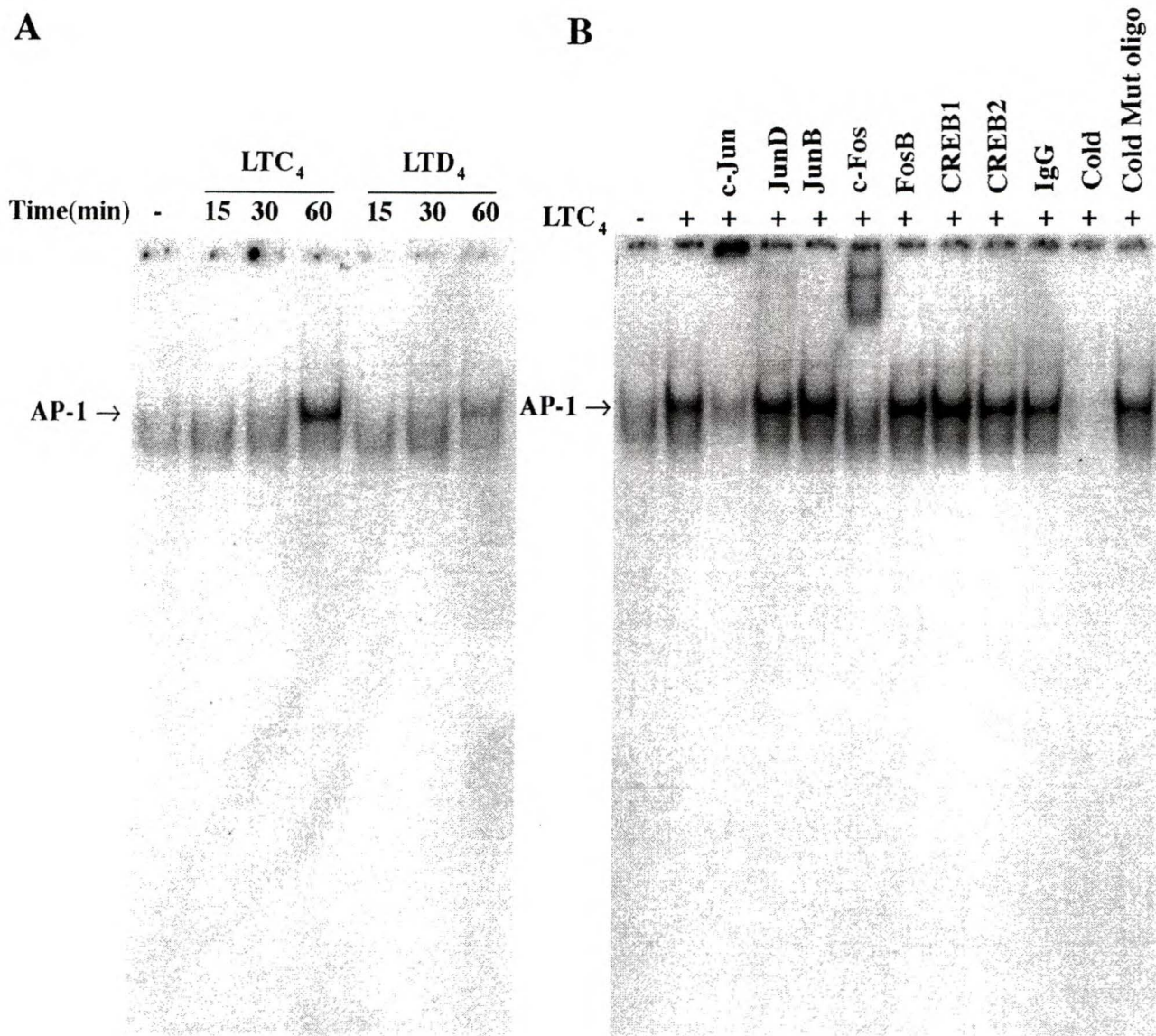


**Figure 3**  
Thompson et al

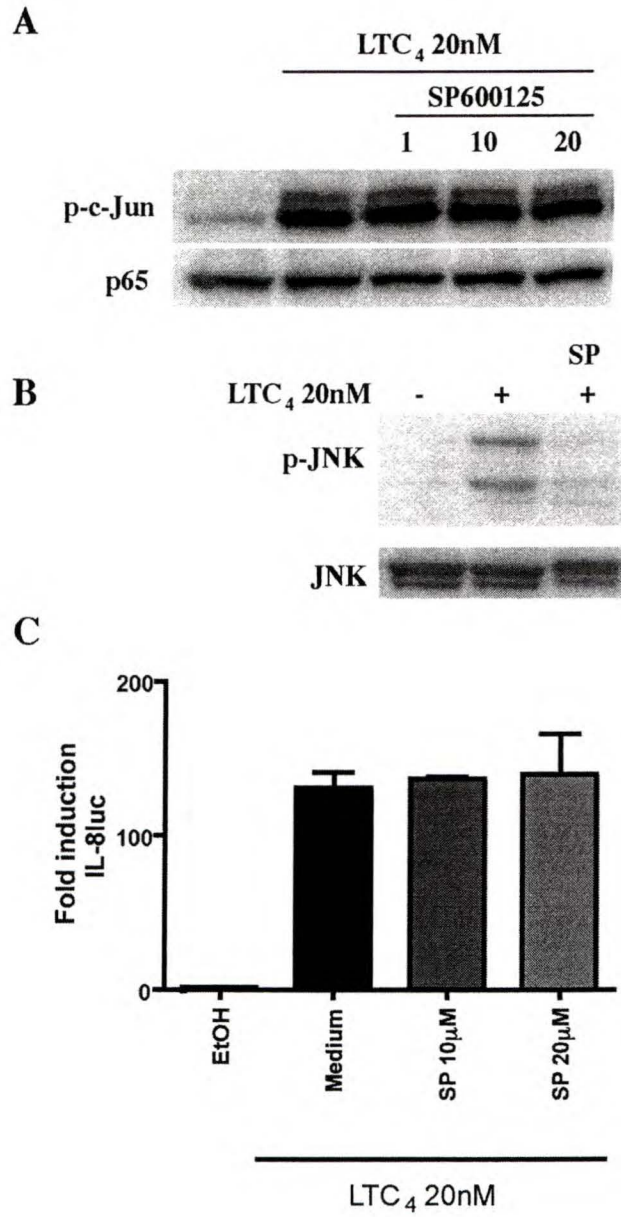


**Figure 4**  
Thompson et al

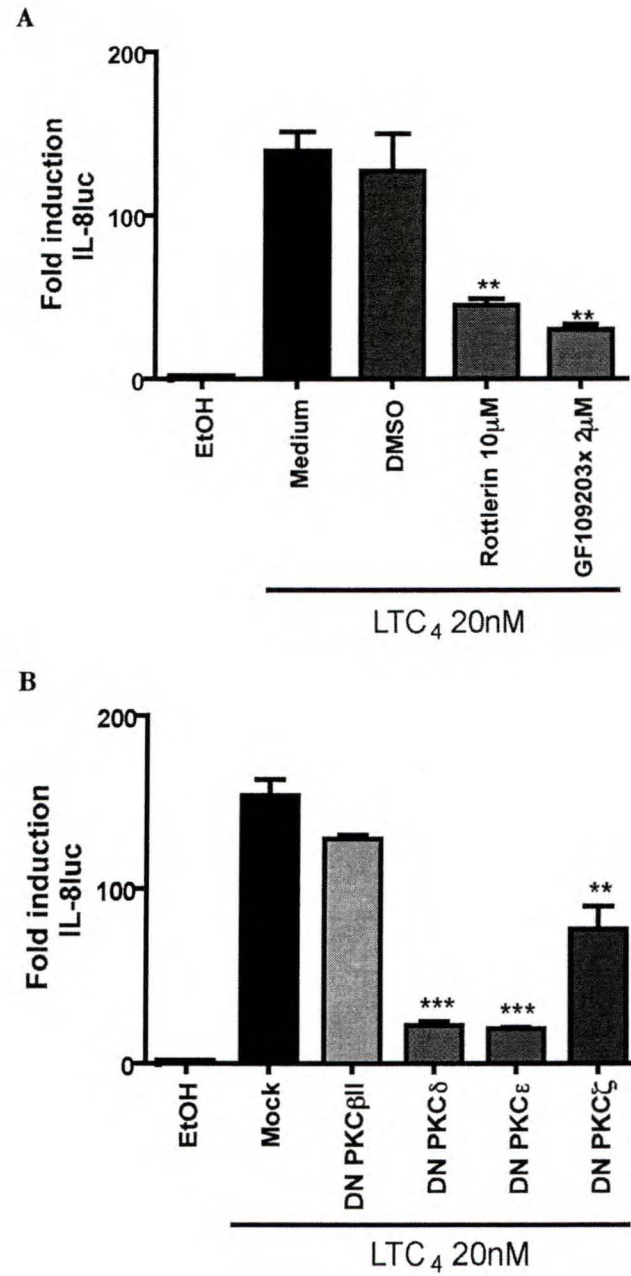




**Figure 5**  
Thompson et al

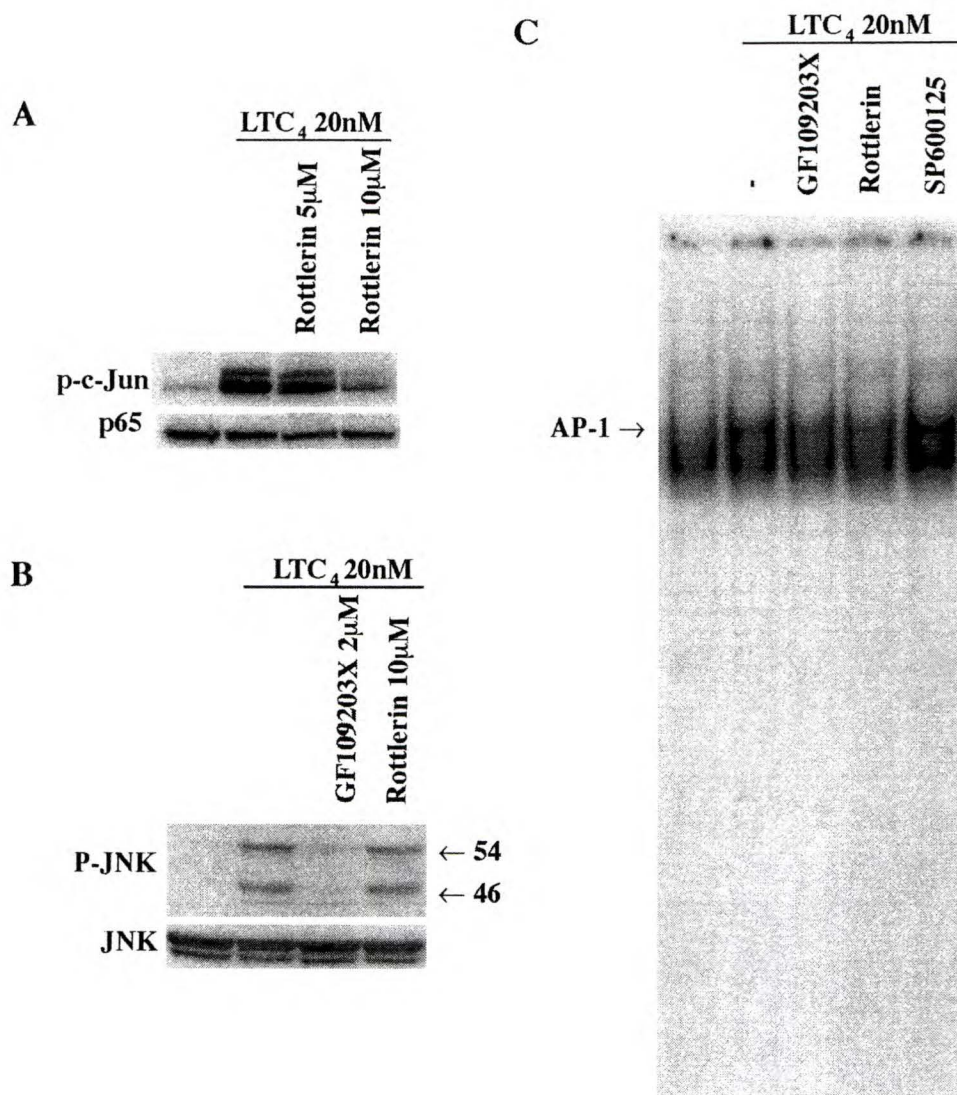


**Figure 6**  
Thompson et al

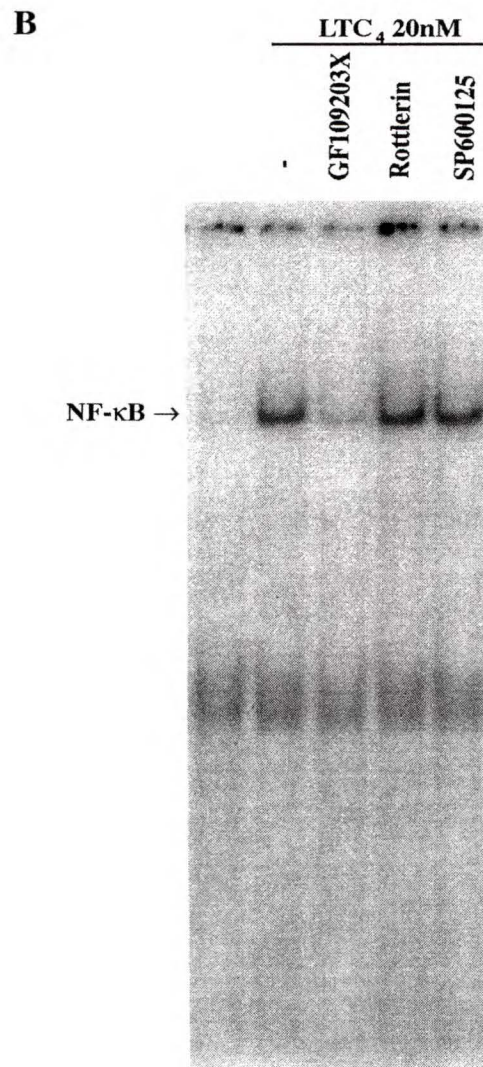
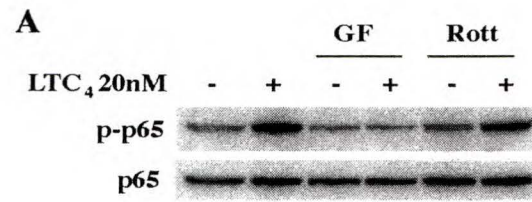


**Figure 7**  
Thompson et al

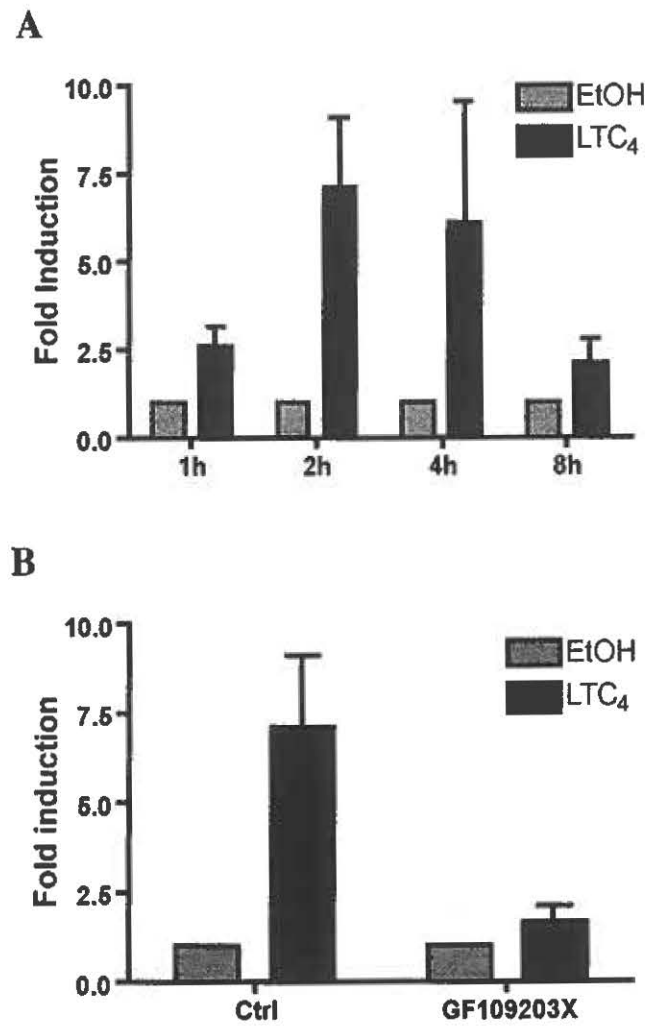




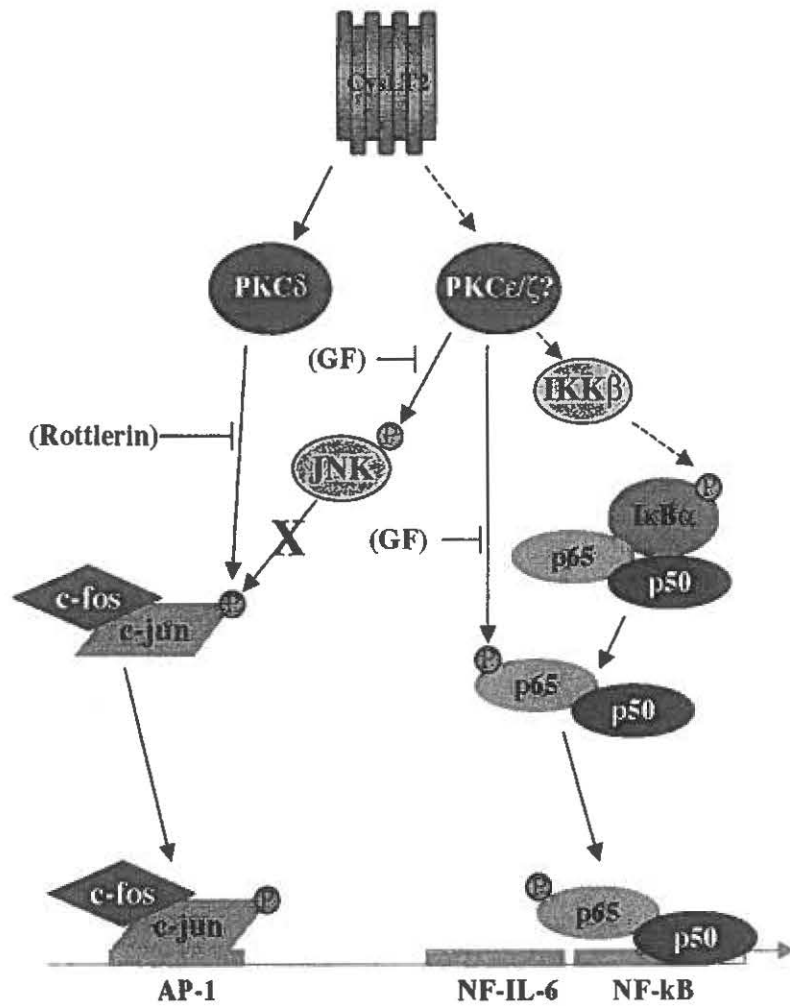
**Figure 8**  
Thompson et al



**Figure 9**  
Thompson et al



**Figure 10**  
Thompson et al



**Figure 11**  
Thompson et al

## REFERENCES

1. Lynch, K. R., O'Neill, G. P., Liu, Q., Im, D. S., Sawyer, N., Metters, K. M., Coulombe, N., Abramovitz, M., Figueroa, D. J., Zeng, Z., Connolly, B. M., Bai, C., Austin, C. P., Chateaufneuf, A., Stocco, R., Greig, G. M., Kargman, S., Hooks, S. B., Hosfield, E., Williams, D. L., Jr., Ford-Hutchinson, A. W., Caskey, C. T., and Evans, J. F. (1999) *Nature* **399**, 789-793
2. Sarau, H. M., Ames, R. S., Chambers, J., Ellis, C., Elshourbagy, N., Foley, J. J., Schmidt, D. B., Muccitelli, R. M., Jenkins, O., Murdock, P. R., Herrity, N. C., Halsey, W., Sathe, G., Muir, A. I., Nuthulaganti, P., Dytko, G. M., Buckley, P. T., Wilson, S., Bergsma, D. J., and Hay, D. W. (1999) *Mol Pharmacol* **56**, 657-663
3. Heise, C. E., O'Dowd, B. F., Figueroa, D. J., Sawyer, N., Nguyen, T., Im, D. S., Stocco, R., Bellefeuille, J. N., Abramovitz, M., Cheng, R., Williams, D. L., Jr., Zeng, Z., Liu, Q., Ma, L., Clements, M. K., Coulombe, N., Liu, Y., Austin, C. P., George, S. R., O'Neill, G. P., Metters, K. M., Lynch, K. R., and Evans, J. F. (2000) *J Biol Chem* **275**, 30531-30536
4. Nothacker, H. P., Wang, Z., Zhu, Y., Reinscheid, R. K., Lin, S. H., and Civelli, O. (2000) *Mol Pharmacol* **58**, 1601-1608
5. Takasaki, J., Kamohara, M., Matsumoto, M., Saito, T., Sugimoto, T., Ohishi, T., Ishii, H., Ota, T., Nishikawa, T., Kawai, Y., Masuho, Y., Isogai, T., Suzuki, Y., Sugano, S., and Furuichi, K. (2000) *Biochem Biophys Res Commun* **274**, 316-322
6. Wenzel, S. E., Larsen, G. L., Johnston, K., Voelkel, N. F., and Westcott, J. Y. (1990) *Am Rev Respir Dis* **142**, 112-119
7. Lam, S., Chan, H., LeRiche, J. C., Chan-Yeung, M., and Salari, H. (1988) *J Allergy Clin Immunol* **81**, 711-717
8. Macfarlane, A. J., Dworski, R., Sheller, J. R., Pavord, I. D., Kay, A. B., and Barnes, N. C. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1553-1558
9. Pavord, I. D., Ward, R., Woltmann, G., Wardlaw, A. J., Sheller, J. R., and Dworski, R. (1999) *Am J Respir Crit Care Med* **160**, 1905-1909
10. Devillier, P., Baccard, N., and Advenier, C. (1999) *Pharmacol Res* **40**, 15-29

11. Labat, C., Ortiz, J. L., Norel, X., Gorenne, I., Verley, J., Abram, T. S., Cuthbert, N. J., Tudhope, S. R., Norman, P., Gardiner, P., and et al. (1992) *J Pharmacol Exp Ther* **263**, 800-805
12. Lewis, R. A., Austen, K. F., and Soberman, R. J. (1990) *N Engl J Med* **323**, 645-655
13. Drazen, J. M. (1998) *Am J Respir Crit Care Med* **158**, S193-200
14. Cookson, W. (1999) *Nature* **402**, B5-11
15. Pillai, S. G., Cousens, D. J., Barnes, A. A., Buckley, P. T., Chiano, M. N., Hosking, L. K., Cameron, L. A., Fling, M. E., Foley, J. J., Green, A., Sarau, H. M., Schmidt, D. B., Sprankle, C. S., Blumenthal, M. N., Vestbo, J., Kennedy-Wilson, K., Wixted, W. E., Wagner, M. J., Anderson, W. H., and Ignar, D. M. (2004) *Pharmacogenetics* **14**, 627-633
16. Thompson, M. D., Storm van's Gravesande, K., Galczenski, H., Burnham, W. M., Siminovitch, K. A., Zamel, N., Slutsky, A., Drazen, J. M., George, S. R., Evans, J. F., and O'Dowd, B. F. (2003) *Pharmacogenetics* **13**, 641-649
17. Beller, T. C., Maekawa, A., Friend, D. S., Austen, K. F., and Kanaoka, Y. (2004) *J Biol Chem* **279**, 46129-46134
18. Lotzer, K., Spanbroek, R., Hildner, M., Urbach, A., Heller, R., Bretschneider, E., Galczenski, H., Evans, J. F., and Habenicht, A. J. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, e32-36
19. Qiu, H., Gabrielsen, A., Agardh, H. E., Wan, M., Wetterholm, A., Wong, C. H., Hedin, U., Swedenborg, J., Hansson, G. K., Samuelsson, B., Paulsson-Berne, G., and Haeggstrom, J. Z. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 8161-8166
20. Figueroa, D. J., Borish, L., Baramki, D., Philip, G., Austin, C. P., and Evans, J. F. (2003) *Clin Exp Allergy* **33**, 1380-1388
21. Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N., and Matsushima, K. (1994) *J Leukoc Biol* **56**, 559-564
22. Ordonez, C. L., Shaughnessy, T. E., Matthay, M. A., and Fahy, J. V. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 1185-1190
23. Gibson, P. G., Simpson, J. L., and Saltos, N. (2001) *Chest* **119**, 1329-1336

24. Norzila, M. Z., Fakes, K., Henry, R. L., Simpson, J., and Gibson, P. G. (2000) *Am J Respir Crit Care Med* **161**, 769-774
25. Hoffmann, E., Dittrich-Breiholz, O., Holtmann, H., and Kracht, M. (2002) *J Leukoc Biol* **72**, 847-855
26. Senftleben, U., and Karin, M. (2002) *Crit Care Med* **30**, S18-S26
27. Zingarelli, B., Sheehan, M., and Wong, H. R. (2003) *Crit Care Med* **31**, S105-111
28. Hayden, M. S., and Ghosh, S. (2004) *Genes Dev* **18**, 2195-2224
29. Angel, P., Hattori, K., Smeal, T., and Karin, M. (1988) *Cell* **55**, 875-885
30. Chen, L. C., Chen, B. K., Chang, J. M., and Chang, W. C. (2004) *Biochim Biophys Acta* **1683**, 38-48
31. Barnes, P. J., and Adcock, I. M. (1998) *Eur Respir J* **12**, 221-234
32. Stein, B., and Baldwin, A. S., Jr. (1993) *Mol Cell Biol* **13**, 7191-7198
33. Matsusaka, T., Fujikawa, K., Nishio, Y., Mukaida, N., Matsushima, K., Kishimoto, T., and Akira, S. (1993) *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**, 10193-10197
34. Vlahopoulos, S., Boldogh, I., Casola, A., and Brasier, A. R. (1999) *Blood* **94**, 1878-1889
35. Stankova, J., D'Orleans-Juste, P., and Rola-Pleszczynski, M. (1996) *Am J Physiol* **271**, C1073-1078
36. Mukaida, N., Mahe, Y., and Matsushima, K. (1990) *J Biol Chem* **265**, 21128-21133
37. Brach, M. A., de Vos, S., Arnold, C., Gruss, H. J., Mertelsmann, R., and Herrmann, F. (1992) *Eur J Immunol* **22**, 2705-2711
38. Weyrich, A. S., McIntyre, T. M., McEver, R. P., Prescott, S. M., and Zimmerman, G. A. (1995) *J Clin Invest* **95**, 2297-2303
39. Baeuerle, P. A., and Baltimore, D. (1989) *Genes Dev* **3**, 1689-1698
40. Palombella, V. J., Rando, O. J., Goldberg, A. L., and Maniatis, T. (1994) *Cell* **78**, 773-785
41. Traenckner, E. B., Pahl, H. L., Henkel, T., Schmidt, K. N., Wilk, S., and Baeuerle, P. A. (1995) *Embo J* **14**, 2876-2883
42. Kaminska, B., Pyrzynska, B., Ciechomska, I., and Wisniewska, M. (2000) *Acta Neurobiol Exp (Wars)* **60**, 395-402

43. Tan, S. L., and Parker, P. J. (2003) *Biochem J* **376**, 545-552
44. Spitaler, M., and Cantrell, D. A. (2004) *Nat Immunol* **5**, 785-790
45. Cummings, R., Zhao, Y., Jacoby, D., Spannhake, E. W., Ohba, M., Garcia, J. G., Watkins, T., He, D., Saatian, B., and Natarajan, V. (2004) *J Biol Chem* **279**, 41085-41094
46. Koon, H. W., Zhao, D., Zhan, Y., Simeonidis, S., Moyer, M. P., and Pothoulakis, C. (2005) *J Pharmacol Exp Ther* **314**, 1393-1400
47. Thodeti, C. K., Nielsen, C. K., Paruchuri, S., Larsson, C., and Sjolander, A. (2001) *Exp Cell Res* **262**, 95-103
48. Chen, L. Y., Doerner, A., Lehmann, P. F., Huang, S., Zhong, G., and Pan, Z. K. (2005) *J Biol Chem* **280**, 22497-22501
49. Diaz-Meco, M. T., Berra, E., Municio, M. M., Sanz, L., Lozano, J., Dominguez, I., Diaz-Golpe, V., Lain de Lera, M. T., Alcami, J., Paya, C. V., and et al. (1993) *Mol Cell Biol* **13**, 4770-4775
50. Lallena, M. J., Diaz-Meco, M. T., Bren, G., Paya, C. V., and Moscat, J. (1999) *Mol Cell Biol* **19**, 2180-2188
51. Anrather, J., Csizmadia, V., Soares, M. P., and Winkler, H. (1999) *J Biol Chem* **274**, 13594-13603
52. Duran, A., Diaz-Meco, M. T., and Moscat, J. (2003) *Embo J* **22**, 3910-3918
53. Sjostrom, M., Johansson, A. S., Schroder, O., Qiu, H., Palmblad, J., and Haeggstrom, J. Z. (2003) *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **23**, e37-41
54. Uzonyi, B., Lotzer, K., Jahn, S., Kramer, C., Hildner, M., Bretschneider, E., Radke, D., Beer, M., Vollandt, R., Evans, J. F., Funk, C. D., and Habenicht, A. J. (2006) *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**, 6326-6331



## CHAPITRE III

### **Le LTD<sub>4</sub> induit l'expression de la furine : Implication potentielle dans le remodelage pulmonaire**

Charles Thompson , Stéphanie McMahon, Ynuk Bossé, Claire M. Dubois,  
Jana Stankova, Marek Rola-Pleszczynski

Article soumis à la revue: *Journal of Immunology* en août 2006

## INTRODUCTION

### LA FURINE

Dans cette section, nous aborderons un autre aspect de la pathologie asthmatique, c'est-à-dire, les changements de structures pulmonaires. Comme mentionné précédemment, les mécanismes de remodelage pulmonaire impliquent un grand nombre de facteurs de croissance, des éléments de la matrice extracellulaire, ainsi que des métalloprotéinases. Parmi ces molécules, plusieurs sont synthétisées sous forme de proprotéines précurseurs, qui nécessitent une maturation/activation par clivage enzymatique. Ce rôle est joué, entre autres, par une famille de protéines appelées convertases. Les convertases de proprotéines sont des endoprotéases, dont la famille comprend plus de 7 membres : PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/PC6, PC7, PACE4 et la furine (Nakayama, 1997). La localisation intra-cellulaire et tissulaire des différentes convertases confère à chacune un rôle particulier.

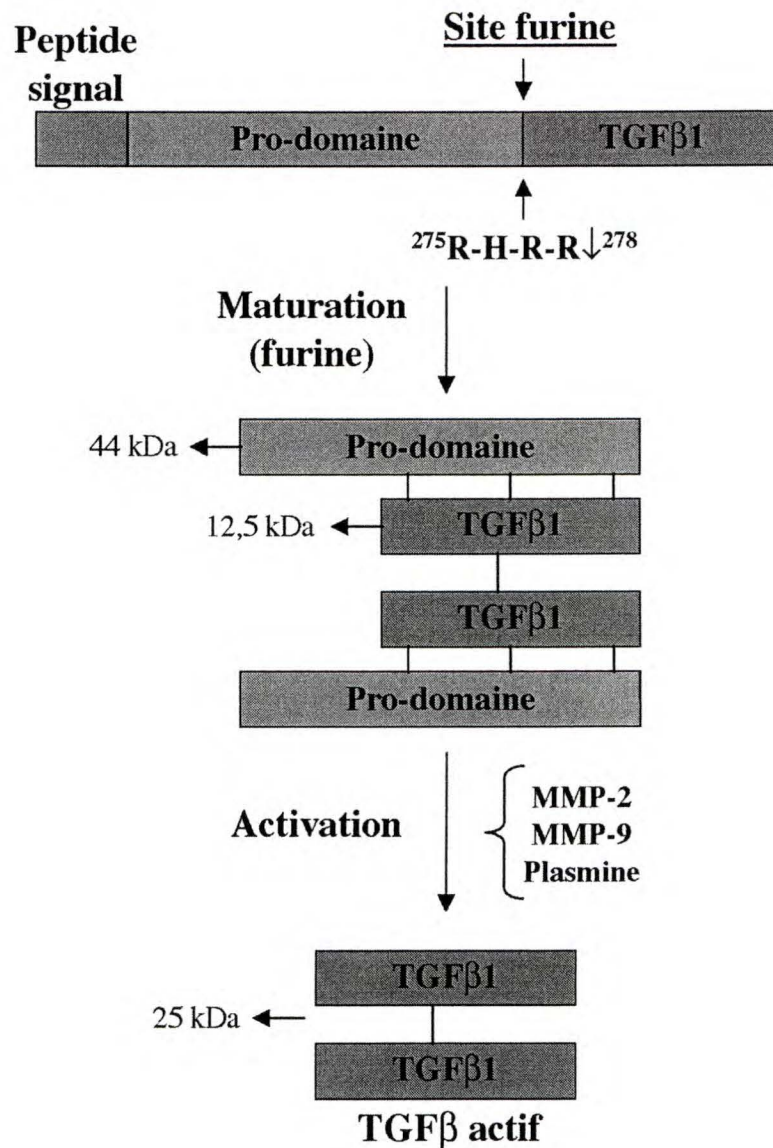
La furine représente le prototype de la famille des convertases de proprotéines. Son gène (*fur*) se retrouve sur le chromosome 15q25q26.1, situé en amont du proto-oncogène *c-fes/fes*, d'où l'origine du nom *fur* (désignant *c-fes/fps upstream region*) (Roebroek et al., 1986). La furine est principalement localisée dans le trans-Golgi et a la capacité de circuler à la membrane plasmique par l'intermédiaire des endosomes (Shapiro et al., 1997). Son expression est ubiquiste; toutefois sa concentration varie selon les tissus (Seidah and Chretien, 1997; Steiner, 1998). La furine se définit comme étant une sérine protéase dépendante du calcium. Elle clive principalement en position c-terminal d'acides aminés basiques R-R ou K-R. En fait, le site spécifique de clivage de la furine nécessite un motif R-X-X-R (Hatsuzawa et al., 1992; Molloy et al., 1992; Nakayama, 1997) ou une séquence optimale R-X-K/R-R (Hatsuzawa et al., 1992; Hosaka et al., 1991). Qui plus est, elle active ou participe à la maturation d'un grand nombre de substrats, incluant des facteurs de croissance, des récepteurs, des protéines de la matrice extracellulaire, ainsi que d'autres protéases (Nakayama, 1997). La furine joue par conséquent un rôle important dans l'homéostasie, ainsi que dans plusieurs pathologies,

comme la maladie d'Alzheimer, le cancer, l'anthrax, la grippe aviaire et la fièvre Ébola (Thomas, 2002).

Comme nous venons de le mentionner, la furine comprend une panoplie de substrats présents dans diverses pathologies. Pour ce travail, nous nous concentrerons sur les substrats potentiellement impliqués dans le remodelage pulmonaire. Curieusement, aucun travail n'a été répertorié établissant un lien entre la furine et l'asthme. Afin de mieux comprendre le processus de maturation, nous prendrons comme exemples deux substrats bien établis de la furine, la métalloprotéinase MT1-MMP (MMP-14) et le TGF $\beta$ .

Dans la section sur le remodelage pulmonaire, nous avons fait un bref survol du rôle des métalloprotéinases dans les maladies pulmonaires. Parmi ces enzymes, la MT1-MMP est un substrat bien connu de la furine. La MT1-MMP possède deux motifs de reconnaissance pour la furine situés entre la pro-région et le domaine catalytique (Yana and Weiss, 2000). Elle se retrouve d'abord sous forme latente, comme protéine de poids moléculaire de 66 kDa. La furine entraîne l'activation de la MT1-MMP par clivage du pro-domaine, ce qui permet la sécrétion de la forme active de 60 kDa. La MT1-MMP active possède la capacité de dégrader le collagène de type 1 et III (d'Ortho et al., 1997) et d'activer la pro-MMP2 à la surface cellulaire (Sounni et al.). Cette activation nécessite toutefois la présence d'un inhibiteur des métalloprotéinases, le TIMP-2 (Shofuda et al.).

Le facteur de croissance TGF $\beta$  voit son expression augmentée dans la maladie asthmatique (Batra et al., 2004; Redington et al., 1997). Sa participation à la pathogénèse de l'asthme est sans équivoque. D'ailleurs, quelques fonctions du TGF $\beta$  dans cette pathologie ont été mentionnées précédemment. Ce qui demeure particulier au TGF $\beta$ , c'est sans aucun doute son mécanisme d'activation : il est d'abord synthétisé sous la forme d'un précurseur inactif (Figure 2). Cette protéine précurseure possède un site de reconnaissance furine, qui doit être clivé afin de rendre la molécule biologiquement active (Assoian et al., 1983; Miyazono et al., 1991). À la suite de la maturation (clivage) par la furine, il en résulte un dimère (25kDa), qui est toutefois conservé sous conformation latente par liaison au prosegment (Miller et al., 1992; Munger et al., 1997).



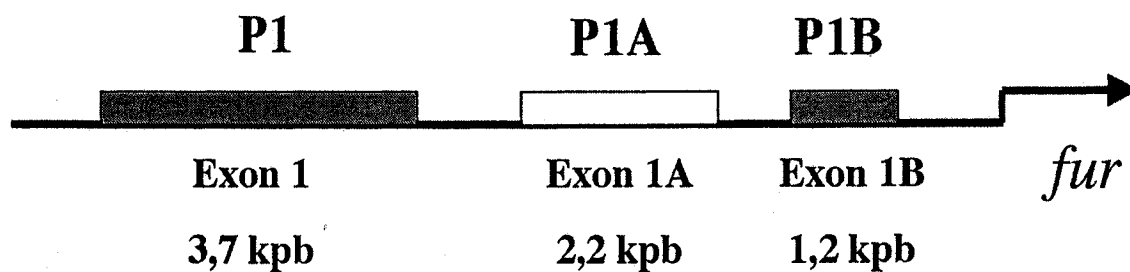
Adapté de McMahon 2005

**Figure 2 : Illustration de la maturation et de l'activation du pro-TGFβ1.** Le clivage du pro-domaine par la furine permet la maturation du TGFβ1. La forme mature du TGFβ1 est ensuite sécrétée sous forme latente due à une liaison non-covalente aux pro-segments. Différentes protéines permettent le relâchement des pro-segments, ce qui intervient dans la libération du TGFβ1 actif (dimère de 25kDa).

L'activation de ce dimère latent de TGF $\beta$  peut s'effectuer par différentes protéases, dont la MMP-2, la MMP-9 et la plasmine, présentes dans le poumon asthmatique (Karsdal et al., 2002; Yu and Stamenkovic, 2000). Ces dernières permettent ainsi la dégradation des prosegments et le relâchement du dimère actif de TGF $\beta$ . Une fois activé, le TGF $\beta$ 1 peut venir se lier à son récepteur, ce qui enclenche l'activation d'une voie de signalisation distinctive, impliquant les protéines Smad (Derynck and Zhang, 2003; Zhang et al., 1996). D'autres voies de signalisation peuvent aussi être induites. Cependant, les Smad demeurent les plus caractéristiques au TGF $\beta$ .

Au niveau de la régulation de son expression, la furine est encore peu explorée. L'activité transcriptionnelle de la furine est sous le contrôle de trois promoteurs distincts, soit le P1, P1A et P1B (Ayoubi et al., 1994) (Figure 3). La région promotrice P1 est composée dans sa portion proximale des éléments TATA et CAAT, ce qui lui confère un caractère inductible. L'analyse de la séquence du promoteur P1, longue de 3,7 kpb, révèle la présence de plusieurs sites potentiels d'activation par des facteurs de transcription. D'ailleurs, le promoteur P1 s'est avéré transactivable par les facteurs de transcription, HIF-1 (McMahon et al., 2005), GATA-1 (Laprise et al., 2002), C/EBP $\beta$  (Ayoubi et al., 1994) et Smad (Blanchette et al., 2001a; Blanchette et al., 2001b). Les promoteurs P1A et P1B, quant à eux, sont caractérisés par des séquences riches en nucléotides GC et comportent un grand nombre de sites de liaison pour le facteur de transcription SP1, suggérant un contrôle de transcription constitutive.

Il existe, bien entendu, des inhibiteurs de la furine. Il y a d'abord les inhibiteurs chimiques, le décanoyl-Arg-Val-Lys-Arg-CH<sub>2</sub>CL, dont la spécificité ne se limite pas à la furine (Jean et al., 1998), et le nona-L-arginine, un peptide de synthèse qui est relativement spécifique (Cameron et al., 2000). On retrouve également un puissant inhibiteur protéique modifié, l' $\alpha$ 1-AT-PDX, qui est spécifique à la furine et possède un *Ki* de 0,6nM (Jean et al., 1998).



Adapté de Ayoubi *et al.*, 1994

**Figure 3 : Représentation schématique de la région en 5' du gène de la furine.** L'expression de la furine est régulée de façon transcriptionnelle et est sous le contrôle de trois promoteurs distincts dont le P1, P1A et P1B, compris dans leurs exons respectifs, exon 1, 1A et 1B.

## RÉSUMÉ

Quelques évidences suggèrent la participation des cysLT dans le remodelage pulmonaire, qui est caractérisé par la fibrogénèse et l'hyperplasie des cellules musculaires lisses des voies aériennes. Nous avons étudié l'effet du LTD<sub>4</sub> sur l'expression de la furine, une convertase de proprotéines impliquée dans la maturation/activation de plusieurs substrats associés aux processus de remodelage. Les cellules HEK293 transfectées de façon stable avec le CysLT1 ont été utilisées afin d'étudier la régulation transcriptionnelle de la furine par le LTD<sub>4</sub>. Nos données démontrent que l'induction de la transcription de la furine est dépendante du temps de stimulation et de la concentration de LTD<sub>4</sub> utilisée. L'étude des promoteurs du gène *fur*, P1, P1A et P1B révèle une transactivation exclusive du promoteur P1 par le LTD<sub>4</sub>. La mutation de l'élément de réponse AP-1 du promoteur P1 entraîne une inhibition partielle de la transactivation induite par le LTD<sub>4</sub>. Le LTD<sub>4</sub> augmente la liaison à l'ADN de AP-1 et GATA sur leurs sites putatifs respectifs situés sur la portion proximale du promoteur P1. Le complexe AP-1 impliqué est composé de c-Jun et c-Fos, alors que le complexe GATA est formé de GATA-4 et -6. De plus, le LTD<sub>4</sub> induit la maturation de substrats de la furine, la MT1-MMP et le TGFβ, qui est inhibée par le α1-PDX, un inhibiteur de la furine. Finalement, le LTD<sub>4</sub> induit l'expression du gène de la furine chez la lignée monocyttaire THP-1, qui est bloquée par un antagoniste spécifique du CysLT1. En résumé, nos résultats démontrent pour la première fois que le LTD<sub>4</sub>, via le récepteur CysLT1, active transcriptionnellement la production de la furine; celle-ci entraîne, en conséquence, la maturation de substrats pertinents pour le remodelage pulmonaire. Ces découvertes suggèrent donc l'implication des cysLT dans les processus de remodelage des voies aériennes via la modulation de la furine.

### Contribution de l'étudiant :

En ce qui concerne les travaux contenus dans le troisième chapitre de cette thèse, Charles Thompson a contribué activement à l'écriture de cet article sous la supervision de son directeur de thèse. L'étudiant a également réalisé toutes les expériences présentées dans ce chapitre à l'exception des travaux présentés aux figures 3 et 5 réalisés en collaboration avec Dre Stéphanie McMahon. Il est important de souligner que Dre Stéphanie

McMahon a produit les constructions en amont du gène rapporteur luciférase pour les mutants de AP-1 et GATA du promoteur P1-Kpn1 du gène *fur*.



**LEUKOTRIENE D<sub>4</sub> UPREGULATES FURIN EXPRESSION THROUGH  
CYSLT1 RECEPTOR SIGNALING: POTENTIAL IMPLICATIONS IN AIRWAY  
REMODELING<sup>1</sup>**

Charles Thompson, Stéphanie McMahon, Ynuk Bossé, Claire M. Dubois, Jana Stankova,  
Marek Rola-Pleszczynski<sup>2</sup>

*Running title:* LTD<sub>4</sub>-induced furin expression

Immunology Division, Department of Pediatrics, Department of Pediatric, Faculty of  
Medicine, Université de Sherbrooke, Sherbrooke, QC, Canada

**Keywords:** Cysteinyl-leukotriene, Furin, AP-1, GATA, MT1-MMP

## ABSTRACT

Leukotriene (LT)<sub>4</sub> is suggested to play a role in airway remodeling, which is characterized by fibrogenesis and airway smooth muscle cell hyperplasia. In this study, we investigated the effects of LTD<sub>4</sub> on the expression of furin, a proprotein convertase involved in the maturation/activation of several substrates implicated in the remodeling processes. HEK293 cells stably transfected with the CysLT1 receptor were used to study the transcriptional regulation of furin by LTD<sub>4</sub>. Stimulation of the cells with LTD<sub>4</sub> resulted in a time- and concentration-dependent induction of furin mRNA and protein expression. The study of furin gene (*fur*) promoters, P1, P1A and P1B revealed a selective transactivation of the P1 promoter by LTD<sub>4</sub>. A mutation in the AP-1 binding element of the P1 promoter resulted in the partial loss of transactivation by LTD<sub>4</sub>. Binding of AP-1 and GATA transcription factors to fur P1 promoter following stimulation with LTD<sub>4</sub> was demonstrated by EMSA, and supershift assays indicated the formation of c-Jun/c-Fos and GATA4/6 complexes, respectively. LTD<sub>4</sub> induced the maturation of the furin substrates MT1-MMP and TGFβ1, which was inhibited by the furin inhibitor α1-PDX. Finally, LTD<sub>4</sub> induced furin gene expression in monocytic THP-1 cells which was abrogated using selective CysLT1 receptor antagonists. Our data show for the first time that LTD<sub>4</sub>, via the CysLT1 receptor, can transcriptionally activate furin production with consequent maturation of furin substrates relevant to airway remodeling. These findings suggest the implication of CysLT1 in remodeling processes through modulation of furin transcription.

## INTRODUCTION

Cysteinyl-leukotrienes (cysLT)<sup>3</sup> are potent lipid mediators implicated in the pathogenesis of allergy and asthma. They are mainly released by eosinophils, mast cells and macrophages in the airways (1). Leukotriene (LT)C<sub>4</sub>, LTD<sub>4</sub> and LTE<sub>4</sub> act on two G-protein-coupled receptors, CysLT1 and CysLT2 (2-6). High levels of expression of CysLT1 have been demonstrated in the lung, spleen and peripheral blood leukocytes (2, 3). Several studies suggest that LTD<sub>4</sub> may play a role as a protagonist of airway remodeling, which is characterised by fibrogenesis and airway smooth muscle cell proliferation. We and others have previously reported that cysLTs may contribute to human bronchial smooth muscle cell proliferation (7, 8). Recently, Lex and coworkers established an association between cysLTs in the exhaled breath condensate and reticular basement membrane thickening in human asthma (9). Moreover, Henderson and colleagues demonstrated that CysLT1 antagonists could reduce airway remodeling in a murine asthma model (10). In addition, increased levels of cysLTs have been found in pathologies that include fibrotic processes, such as severe asthma (11, 12) and cystic fibrosis (13).

Airway remodeling involves many fibrogenic molecules known to increase extracellular matrix (ECM) production and turnover, as well as airway smooth muscle cell proliferation. Several of these proteins are first synthesized as larger inactive propeptides that need maturation by endoproteolytic cleavage to become active. This is the case of transforming growth factor  $\beta$ 1 (TGF $\beta$ 1), platelet-derived growth factor (PDGF), insulin-like growth factor (IGF) and metalloproteinases (MMP), including membrane-type 1 matrix metalloproteinase (MT1-MMP). The proprotein convertase (PC) furin is one of the proteases responsible for this kind of specific cleavage. Furin is a member of 7 closely related mammalian subtilisin/kexin-like serine proteases. This group of proprotein convertases includes PC1/PC3, PC2, PC4, PC5/PC6, PC7, PACE4, and furin (14). Within this family, selected members exhibit a tissue-specific distribution, such as PC1, PC2, and PC4, whereas furin, PACE-4, PC5/PC6, and PC7 are expressed in a broad

range of tissues (15, 16). The wide distribution of PCs is in accordance with their involvement in several physiological and pathological processes.

The mechanisms of activation of the *fur* gene in a context of inflammation have not been investigated as yet. Furin gene expression is regulated by three distinct promoters, namely P1, P1A and P1B. As with housekeeping genes, the P1A and P1B promoters contain several Sp1-binding sites in their sequence. Conversely, the P1 promoter bears inducible gene features, with TATA and CAAT elements in its proximal region. Previous reports demonstrated transactivation of the P1 promoter by C/EBP- $\beta$ , Smads and HIF-1 (17-20). Proximal *fur* P1 promoter analysis also revealed an AP-1-binding site in position -179. We recently demonstrated that LTD<sub>4</sub>, through the CysLT1 receptor, could activate the AP-1 signaling pathway, in the context of IL-8 expression (20). Furthermore, the proximal *fur* P1 promoter also contains two GATA binding sites, motifs that are important for furin expression in megakaryoblastic cells (18).

Little is known about the mechanisms by which cysLTs orchestrate remodeling and fibrosis in asthma. From the proposed relationship between cysLTs and airway remodeling as well as the established relationship between furin and pro-fibrogenic substrate maturation/activation, we hypothesized that LTD<sub>4</sub> could modulate the expression and function of furin. In the present report, we demonstrated that LTD<sub>4</sub> up-regulates furin expression at both the mRNA and protein levels. Up-regulation of furin expression by cysLTs resulted in the maturation of the furin substrates MT1-MMP and TGF $\beta$ .

## MATERIALS AND METHODS

### *Antibodies and reagents*

Specific antibodies against human MT1-MMP hinge region were purchased from Research Diagnostics Inc. and GATA-1 (sc-1233X), GATA-2 (sc-1235X), GATA-4 (sc-1237X), GATA-6 (sc-7244X), c-Jun (sc-1694X), c-Fos (sc-52X), JunD (sc-74X), were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). A monoclonal mouse IgG1 antibody directed against human furin was purchased from Alexis Biochemicals (San Diego, CA). LTD<sub>4</sub> was obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI). Anti-actin, Aprotinin, 4-(2 aminoethyl)benzenesulfonyl fluoride (AEBSF), leupeptin, NaF, soybean trypsin inhibitor, and Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> were from Sigma-Aldrich (Oakville, ON, Canada). Hygromycin B (Wisent, St-Bruno, QC, Canada) and FuGENE6 were purchased from Roche (Laval, QC, Canada). Montelukast (MK-476) was obtained from Merck Frosst (Pointe-Claire, QC, Canada).

### *Plasmids*

The human *fur* promoter luciferase constructs pGL2-P1, pGL2-P1-*SacI*, pGL2-P1-*NheI*, pGL2-P1-*KpnI*, pGL2-P1A, and pGL2-P1B were generously provided by Dr Torik A. Y. Ayoubi (University of Leuven and Flanders Interuniversity, Belgium). The pcDNA3.1-MT1-MMP construct was generously provided by Dr R. Béliveau (Hôpital Ste-Justine-Université du Québec à Montréal, Montréal) and pcDNA3- $\alpha$ 1-PDX was prepared as previously described (21).

### *Cells*

Human monocytic THP-1 cells (ATCC, Rockville, MD) were cultured in RPMI-1640 medium (Life technologies, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum, 100 U/mL penicillin and 100  $\mu$ g/mL streptomycin (Sigma-Aldrich). HEK293 stably expressing CysLT1 were grown in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) with glucose (Life technologies), supplemented with 10% fetal bovine serum (Sigma-Aldrich), gentamicin sulfate (40  $\mu$ g/mL), and 100  $\mu$ g/mL hygromycin B. These cells are referred to as 293LT1. Transient transfections were carried out with FuGENE 6

according to the manufacturer's protocol and experiments were performed 48h post-transfection.

#### *Northern blot analysis*

Total cellular RNA was extracted using TriPure according to the manufacturer's instruction (Roche Diagnostics Canada, Laval, Qc); 15 µg of total RNA were separated by electrophoresis on 1% agarose and transferred onto a Hybond N<sup>+</sup> membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Baie d'Urfé, QC, Canada) for Northern blot analysis. Furin riboprobe synthesis and hybridization were done as previously described (22). 18S RNA expression was used as an internal control.

#### *Western blot analysis*

293LT1 cells were incubated in 6-well plates in medium without serum for 24h, stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) for the indicated times, and lysed as previously described (23).

#### *Electrophoretic mobility shift assays*

EMSA were performed as previously described (23). The sequences of the sense strands of the oligonucleotides used for EMSA were as follows: *fur* -66 GATA sites within the P1 promoter with the respective sequences 5'-GTGCGACCAGATATGTCACCACCACATCACTTTTAG-3' and *fur* -179 P1-AP1 site 5'-GGAAGGAAGTCATTAAGTCAGCCAGTGGCTGGGATGC-3'.

#### *Luciferase assays*

293LT1 cells were seeded in 12-well tissue culture plates 24h before transient transfection using 1.5 µl of FuGENE 6 transfection reagent and 0.5 µg of plasmid DNA (*fur* promoter-luciferase constructs or promoter-less pGL2 plasmid) per well according to the manufacturer's instructions. The day after transfection, cells were serum-starved overnight before stimulation with LTD<sub>4</sub> (10nM) or equivalent vehicle (ethanol : EtOH) concentration for 6h. Cell lysates were assayed for luciferase activity, which was normalized for basal activity of promoter-less pGL2.

### *Site-directed Mutagenesis*

The AP-1 sequence located at position -179 within the P1-*KpnI* promoter were mutated using the QuikChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA). Distinct mutations were generated by replacing 5'-AGTCAG-3' by 5'-ACTTGG-3'. Mutations was verified by direct sequencing.

### *TGF $\beta$ bioassay*

The presence of active TGF $\beta$  in cell cultures or in conditioned media was determined by stimulation of a TGF $\beta$ -responsive luciferase reporter p(SBE)<sub>4</sub>-Luc containing 4 copies of the Smad binding element found in the human PAI-1 promoter sequence. Values represent luciferase reporter gene activity as previously described (19) .

### *Statistical analyses*

Where mentioned, statistical significance was determined using the Student's *t* test for paired data (one-tailed) using PRISM4 software. Differences were considered significant at  $p \leq 0.05$ .

## RESULTS

### *LTD<sub>4</sub> regulates endogenous furin synthesis in 293LT1 cells.*

Cell populations which express CysLT1 usually also express CysLT2, the second member of the cysLT receptor family, responsive to the same agonists. Transfected cell lines stably expressing only the CysLT1 receptor, the 293LT1 cells, as previously described (23), were used to dissect selective receptor-mediated mechanisms. Time-course and concentration-response experiments were conducted to investigate the effect of LTD<sub>4</sub> on furin expression in 293LT1 cells. Kinetics of furin mRNA expression following LTD<sub>4</sub> stimulation are shown in figure 1A. Results indicate an upregulation of furin mRNA expression starting at 6h and maintained through 24h of LTD<sub>4</sub> stimulation. Furin mRNA expression was dependent on the concentration of LTD<sub>4</sub>, as illustrated in figure 1B, with a maximal effect at 10nM of LTD<sub>4</sub> for 8h. Figure 1C illustrates the significant accumulation of furin protein in response to LTD<sub>4</sub> after 16h of stimulation. These results indicate that furin can be induced by cysLTs at both the mRNA and the protein level.

### *Analysis of fur promoter activity in response to LTD<sub>4</sub>.*

Furin transcription is driven by three alternative promoters, P1, P1A and P1B. Since we observed that LTD<sub>4</sub> increased furin mRNA expression, we investigated whether LTD<sub>4</sub> could induce furin transcription and if so, which promoter was involved. In brief, we measured the capacity of LTD<sub>4</sub> to activate the transcription of a luciferase reporter gene driven by each promoter. As shown in figure 2A, LTD<sub>4</sub> strongly increased P1 promoter activity (up to 7 fold), whereas, in contrast, it had no effect on P1A and P1B promoters. To define the P1 promoter region involved in this response, 5' deletion constructs were tested. Results in figure 2B indicate that P1 promoter activity in response to LTD<sub>4</sub> stimulation gradually decreased following truncation of the distal promoter region. These results suggest the presence of active transcription sites dispersed throughout the P1 promoter. Transactivation activity of P1-*KpnI* deletion mutant was significantly reduced by 27% as compared to the full length promoter. The shorter P1-*KpnI* region, however, still demonstrated significant promoter activity (4-fold) in response to LTD<sub>4</sub>, which



indicates that the proximal region of P1 is responsible for the greater part of the transcriptional activity induced by LTD<sub>4</sub>. We therefore decided to focus on the proximal region of the P1 promoter in subsequent experiments.

*Analysis of the AP-1 binding site within the P1-KpnI promoter region.*

Nucleotide sequence of the proximal fragment (P1-KpnI) revealed the presence of a potential AP-1 binding site (5'-AGTCAG-3') at position -179. Thus, we assessed whether AP-1 DNA binding to *fur* P1 promoter was induced by LTD<sub>4</sub>. As illustrated in figure 3A, exposure of 293LT1 cells to LTD<sub>4</sub> resulted in time-dependent induction of AP-1 DNA binding activity, which could be observed within 60 min of stimulation. In order to study the nature of the complex induced by LTD<sub>4</sub>, supershift experiments were performed using specific antibodies directed against c-Jun, JunD or c-Fos. Results in figure 3B indicate that the AP-1 binding complex induced by LTD<sub>4</sub> was composed of c-Jun and c-Fos. To determine the implication of the AP-1 site in the context of LTD<sub>4</sub> stimulation, we used a *fur* P1-KpnI promoter construct containing a site-specific mutation. As shown in figure 4, the AP-1 site mutation significantly reduced the P1 promoter activity induced by LTD<sub>4</sub>.

*Effect of LTD<sub>4</sub> stimulation on GATA binding sites of the proximal fur P1 promoter.*

The P1-KpnI promoter also contains potential GATA binding sites. Therefore, we tested whether treatment of 293LT1 cells with LTD<sub>4</sub> induced GATA binding to the *fur* P1 promoter. Figure 5A shows the kinetics of activation by LTD<sub>4</sub> of GATA binding to the cognate *cis* element, with a detectable enhancement within 60 min and strong induction at 2h. Analysis of the binding complex was done at 2h using selected antibodies. As shown in Figure 5B, the LTD<sub>4</sub>-inducible complex contained both GATA-4 and GATA-6, while no retarded bands could be observed using GATA-1 and 2 antibodies. Surprisingly, mutations within the GATA binding site failed to reduce LTD<sub>4</sub>-inducible GATA binding or *fur* P1 transactivation (data not shown).

*Impact of increased furin expression on substrate maturation.*

We investigated whether furin expression induced by LTD<sub>4</sub> correlated with an increase in maturation/activation of the furin substrates, MT1-MMP and TGF $\beta$ . These substrates contain specific furin cleavage sites, and play roles in remodeling processes. We overexpressed MT1-MMP in 293LT1 cells in order to analyze the generation of a digestion product in response to LTD<sub>4</sub> stimulation. As illustrated in figure 6A, a high molecular weight band (66 kDa) corresponding to the unprocessed MT1-MMP precursor is seen in all culture conditions. LTD<sub>4</sub> induced conversion of the MT1-MMP precursor into the 60 kDa mature form, which was totally abrogated by overexpression of  $\alpha$ 1-PDX, a specific furin inhibitor. We also studied the impact of furin upregulation on TGF $\beta$  activity. Following binding to its cognate receptor, TGF $\beta$  activates the Smad signaling pathway. Hence, to investigate bioactive TGF $\beta$  secretion, 293LT1 cells were transfected with the TGF $\beta$ -inducible reporter (SBE)<sub>4</sub>-luc, a reporter gene that specifically responds to Smad protein-induced transactivation (24). As shown in figure 6B, LTD<sub>4</sub> induced a strong activation of the TGF $\beta$ -inducible reporter, which was partially prevented by cotransfection with  $\alpha$ 1-PDX.

*LTD<sub>4</sub> induces fur gene expression in human monocytic THP-1 cells.*

In order to study the effect of LTD<sub>4</sub> on furin expression through the endogenous CysLT1 receptor, we used human monocytic THP-1 cells as a model. The CysLT1 receptor is expressed in mononuclear phagocytes and, as we previously reported, it is up-regulated by IL-4 and IL-13 (25). Based on this, THP-1 cells were cultured in the presence of IL-4 (10 ng/mL) for 24h before stimulation with LTD<sub>4</sub> or vehicle (EtOH) for 8h. As shown in Fig 7, LTD<sub>4</sub> induced expression of furin mRNA in THP-1 cells, which was prevented by pretreatment with the selective CysLT1 antagonist MK-476 (montelukast), indicating that the effect induced by LTD<sub>4</sub> was mediated through the CysLT1 receptor.

## DISCUSSION

Airway remodeling is a feature of chronic severe asthma, chronic obstructive pulmonary disease (COPD), acute respiratory distress syndrome (ARDS) and idiopathic pulmonary fibrosis (26, 27). In chronic asthma, the phenomenon is characterised by airway smooth muscle cell hyperplasia, extracellular matrix deposition, angiogenesis and microvascular remodeling under the influence of fibrogenic molecules (27). Among these, TGF $\beta$  (28, 29), PDGF (30, 31) IGF (32) and MT1-MMP (33, 34) all contain specific furin cleavage sites. The correlation between the presence of the convertase furin and airway pathology, however, has not been demonstrated as yet.

CysLTs are well characterized as major players in pulmonary inflammation. LTD<sub>4</sub>, through the CysLT1 receptor, is responsible for bronchoconstriction and mucus hypersecretion (35-37). Some evidence also supports the implication of cysLTs in pulmonary remodeling processes, but the mechanisms remain unclear. In this work, we propose a mechanism by which cysLTs could orchestrate airway remodeling, namely through the regulation of furin expression. We demonstrated that LTD<sub>4</sub>, via the CysLT1 receptor, can induce the expression of furin, a well characterized proprotein convertase that plays a role in proteolytic processing/activation of proproteins. Interestingly, a recent study demonstrated that platelet-activating factor (PAF), another inflammatory lipid mediator, can induce furin expression in corneal myofibroblasts (38).

*Fur* gene transcription is under the control of three alternatively spliced promoters. Regulation of *fur* gene expression is still poorly understood, especially in the context of inflammation. The P1A and P1B promoters resemble housekeeping genes with multiple Sp1 binding sites. On the other hand, the P1 promoter is inducible in response to different transcription factors (17, 18, 20, 39). In this respect, using a reporter gene assay, our studies demonstrated that LTD<sub>4</sub>-induced furin expression was transcriptionally regulated, and that, as expected, only the P1 promoter could be induced by LTD<sub>4</sub>. From this, deletion studies of the P1 promoter revealed that the transactivation gradually decreased in response to LTD<sub>4</sub> as the promoter sequence was progressively

truncated in 5'. The proximal P1-*KpnI* promoter, however, was still highly inducible through CysLT1 activation, providing evidence that the proximal fragment could drive *fur* gene activation following LTD<sub>4</sub> stimulation. Analysis of the proximal P1-*KpnI* promoter region revealed the presence of an AP-1 binding site at position -179 and, as reported (18), two GATA motifs at positions -66 and +62.

We recently reported in 293LT1 cells that LTD<sub>4</sub> could induce AP-1 signalling pathways leading to IL-8 transactivation. AP-1 responsive elements are part of many gene promoters, including IL-8 (40), COX-2 (41) and c-Jun (42). AP-1 is a dimeric transcription factor consisting of the Jun (c-Jun, JunB and JunD) and Fos (c-Fos, FosB, Fra-1 and Fra-2) family members (43). The AP-1 complex can also be regulated post-translationally by phosphorylation, which can influence the stability of its members, its transactivating potential as well as its DNA-binding capacity (43). Our results demonstrated that LTD<sub>4</sub> induced a time-dependent induction of AP-1 binding to the proximal P1 promoter. Supershift assays indicated that the AP-1 complex which bound to the *fur* gene was composed of c-Jun and c-Fos. The role of AP-1 in the induction of *fur* gene expression by LTD<sub>4</sub> was demonstrated by a reduction of the P1-*KpnI* promoter transactivation when the AP-1 binding site was mutated. Moreover, we also found LTD<sub>4</sub> to induce phosphorylation of c-Jun in a time-dependent manner (data not shown). This is the first demonstration of the transactivation of the *fur* gene via the AP-1 binding site and it suggests that other activators of AP-1 could also induce *fur* gene transcription.

Our findings also demonstrate for the first time that transcription factors in the GATA family could be involved in CysLT1 signaling. The GATA family is composed of six members, divided into two groups : GATA-1, -2 , -3 expressed in hematopoietic lineage cells and GATA-4, -5, -6 expressed in structural cells (44). For instance, a study in Gata-6-null mice demonstrated the contribution of GATA-6 to the formation of lung epithelium (45). GATA-6 also regulates the expression of genes such as surfactant A and thyroid transcription factor 1 (TTF-1) (46, 47). Our data show that nuclear factor binding to the GATA element within the *fur* P1 promoter was strongly increased in LTD<sub>4</sub>-treated cells in a time-dependent manner, with formation of a complex which included GATA-4

and GATA-6, as indicated by a supershift in EMSA. A physical interaction between GATA-4 and GATA-6 has previously been shown in cardiac myocytes (48). Mutations in the GATA binding site, however, did not prevent GATA binding or *fur* promoter transactivation, suggesting more complex interactions of the transcription factors with the *fur* promoter.

The induction of furin expression by cysLTs may be involved in the increased bioavailability of fibrogenic/angiogenic mediators such as MT1-MMP and TGF $\beta$ . These mediators are well characterized furin substrates that have been shown to play a role in several aspects of remodeling. MT1-MMP, through proteolytic events, regulates various cellular functions, including ECM turnover, promotion of cell migration and invasion. MT1-MMP acts either through direct degradation of ECM components or indirectly by activating pro-MMP2 (49). In addition, these MMPs are involved in the construction of the vascular tubular network, in part, through the release or the activation of growth factors (50, 51). TGF $\beta$ 1, in turn, creates a favorable environment for airway remodeling and fibrosis by repressing immune surveillance, inducing the production of angiogenic factors, such as vascular endothelial growth factor, and by increasing the production of ECM (52, 53). It is well characterized that TGF $\beta$  is up-regulated in asthmatic patients (54, 55). In addition to TGF $\beta$  and MT1-MMP, a multiplicity of other established furin substrates involved in cell growth and survival (insulin-like growth factor receptor-1 and platelet-derived growth factor), cell invasion (E-cadherin and integrins) (56, 57), and angiogenesis (vascular endothelial growth factor-c) (58) support the contention that the regulation of furin activity within the area of pulmonary inflammation could profoundly impact the course of airway remodeling (Figure 8). Furthermore, ADAM33, a disintegrin and metalloprotease 33, a new member of the ADAM family, has been identified as an asthma susceptibility gene via genetic linkage analysis (59). Interestingly, some reports suggest a role for ADAM33 in airway remodeling (60). Indeed, ADAM33 needs to be activated by cleavage within a putative furin cleavage site (61), reinforcing the impact of furin up-regulation in airway remodeling.

In summary, we propose a new mechanism for cysLT involvement in airway remodeling. The current study suggests that LTD<sub>4</sub> not only acts as an acute inflammatory mediator, but can also promote the production of furin, a protease that activates a number of fibrogenic and angiogenic factors implicated in lung remodeling (Figure 8). Selective CysLT1 antagonists could thus be considered for more chronic aspects of asthma, including asthmatic inflammation and airway remodeling.

## ACKNOWLEDGMENTS

The authors thank Dr Torik A. Y. Ayoubi (University of Leuven and Flanders Interuniversity, Belgium) for the *fur* promoter constructs and Dr R. Béliveau (Hôpital Ste-Justine, Montreal QC Canada) for the pcDNA3.1-MT1-MMP construct.

## DISCLOSURES

The authors have no financial conflict of interest.

## FOOTNOTES :

<sup>1</sup>This work was supported by grants (CMD, JS and MR-P) and studentships (CT, SM and YB) from the Canadian Institutes of Health Research and by a Canada Research Chair in Inflammation (MR-P).

<sup>2</sup>Address correspondence and reprint requests to Dr. Marek Rola-Pleszczynski, Immunology Division, Department of Pediatrics, Faculty of Medicine, Université de Sherbrooke, 3001 North 12th Avenue, Sherbrooke, QC J1H 5N4 Canada, Tel.(819) 346-1110 ext:14851, Fax. (819) 564-5215, E-mail address: [marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca](mailto:marek.rola-pleszczynski@usherbrooke.ca)

<sup>3</sup>The abbreviations used are : CysLT, Cysteinyl-leukotriene; LTC<sub>4</sub>, leukotriene C<sub>4</sub>; LTD<sub>4</sub>, leukotriene D<sub>4</sub>; LTE<sub>4</sub>, leukotriene E<sub>4</sub>; MK-476, montelukast; *fur*, furin gene; TGFβ<sub>1</sub>, transforming growth factor β<sub>1</sub>; PDGF, platelet-derived growth factor ; IGF, insuline-like growth factor; MMP, metalloproteinases; MT1-MMP, membrane-type 1 matrix metalloproteinase; PC, proprotein convertase; PAF, platelet activating factor; GPCR, G-protein-coupled receptor; HEK293, Human embryonic kidney 293; COPD, chronic obstructive pulmonary disease; ARDS, acute respiratory distress syndrome.

## FIGURES LEGENDS

**Figure 1. LTD<sub>4</sub> induces furin expression at both mRNA and protein levels.** A) 293LT1 cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for indicated times or B) incubated in presence of LTD<sub>4</sub> or EtOH for 8h at indicated concentrations. Furin mRNA expression is shown by Northern blot analysis using a specific human furin riboprobe. C) Western blot analysis of furin expression by 293LT1 cells stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 16h. Data are representative of three independent experiments.

**Figure 2. Analysis of *fur* promoter activity in response to LTD<sub>4</sub>.** A) 293LT1 cells were transiently transfected with *fur* P1, P1A, or P1B (0,5µg/well). Cells were incubated for 6h with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH before measurement of luciferase activity. B) Schematic representation of *fur* promoter fragments shortened in 5' according to endogenous SacI, NheI, or KpnI restriction sites. Base positions are numbered relative to the TATA box. 293LT1 cells were transiently transfected with *fur* P1, P1-SacI, P1-NheI, or P1-KpnI constructs (0,5µg/well). Cells were incubated for 6h with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to respective EtOH control; \*p< 0.05, using Student's *t* test; n=3.

**Figure 3. LTD<sub>4</sub> up-regulates AP-1 DNA binding to *fur* P1 promoter.** A) 293LT1 cells were cultured in presence of LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for indicated times prior to nuclear extract preparation. The nuclear extracts were analyzed by EMSA using *fur* P1 promoter AP-1 oligonucleotide radiolabeled probe. B) Cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 2h before EMSA analysis. The specificity of complex formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold probe, lane 7) and by including specific anti-c-Jun (lane 3), anti-c-Fos (lane 4), or anti-JunD (lane 5) antibodies, or an isotype-matched control antibody (lane 6). SS: Supershift.

**Figure 4. Implication of AP-1 binding site in *fur* P1-*KpnI* promoter transactivation by LTD<sub>4</sub>.** 293LT1 cells were transiently transfected with 0,5µg/well of pGL2 (promoterless vector), P1-*KpnI*-WT or P1-*KpnI*-ΔAP-1 promoter constructs. Cells were



incubated for 6h with EtOH or LTD<sub>4</sub> (10nM) before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to EtOH control. \*p< 0.05 relative to EtOH control cells, n=3.

**Figure 5. LTD<sub>4</sub> up-regulates GATA DNA binding to *fur* P1 promoter.** A) 293LT1 cells were cultured in presence of LTD<sub>4</sub> 10nM or EtOH for indicated times prior to nuclear extract preparation. The nuclear extracts were analyzed in EMSA using *fur* P1 promoter GATA oligonucleotide radiolabeled probe. B) Cells were stimulated with LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 2h before EMSA analysis. The specificity of complex formation was tested by the inclusion of unlabeled competitors (cold probe 25x, lane 8; or 100x, lane 9) and by including specific anti-GATA1 (lane 3), anti-GATA2 (lane 4), anti-GATA4 (lane 5), or anti-GATA6 (lane 6) antibodies, or an isotype-matched control antibody (lane 7). OE: over-exposure of the supershift area of the blot.

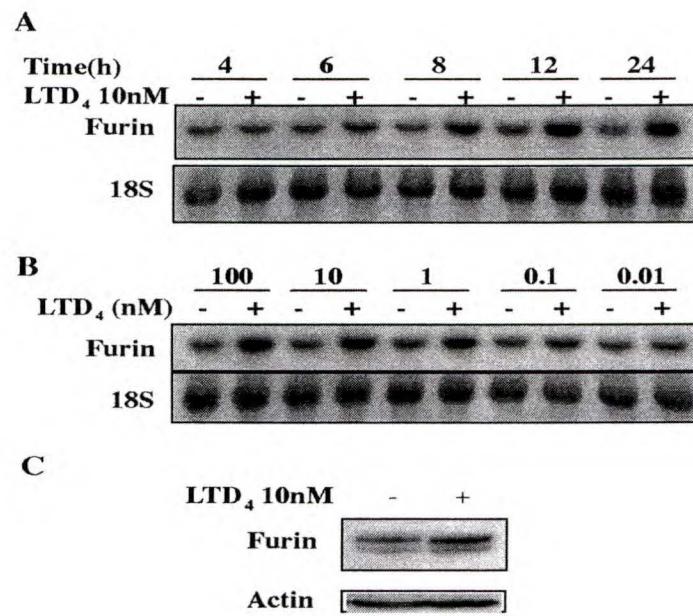
**Figure 6. Biological impact of LTD<sub>4</sub>-induced furin gene expression.** A) Western blot analysis of furin processing of MT1-MMP. 293LT1 cells were transiently transfected with MT1-MMP and an empty vector or the furin inhibitor  $\alpha$ 1-PDX and cultured in presence of LTD<sub>4</sub> (10nM) or EtOH for 24h. Total proteins were separated by electrophoresis and analyzed by Western blot using indicated antibodies. Total actin protein expression served as internal control. This experiment is representative of three. B) 293LT1 cells were transiently transfected with the TGF $\beta$ -inducible reporter (SBE)<sub>4</sub>-Luc and empty vector or the furin inhibitor  $\alpha$ 1-PDX and cultured in presence of EtOH or LTD<sub>4</sub> (10nM) for 24h before measurement of luciferase activity. Data are expressed as fold increase relative to respective EtOH control; \*p< 0.05, using paired Student's t-test; n=3.

**Figure 7. Induction of furin gene expression by LTD<sub>4</sub> in monocytic THP-1 cells.** THP-1 cells were cultured for 24h in presence of IL-4 (10ng/mL) before addition of LTD<sub>4</sub>. A) Northern blot analysis of Furin mRNA expression in THP-1 cells preincubated in the absence or presence of the CysLT1 antagonist MK-476 (1  $\mu$ M) and then cultured for 8h in the presence of (10nM) LTD<sub>4</sub> or vehicle (EtOH). The 18S RNA expression was

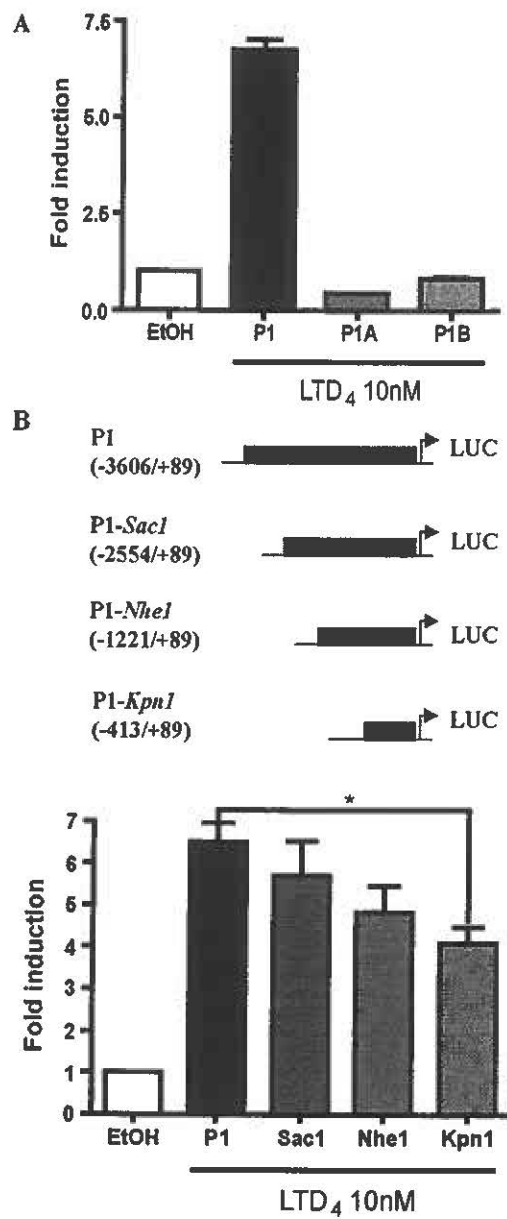
used as an internal control. Results are representative of two separate experiments. B) Densitometry ratio Furin/18S of results presented in A, \* $p < 0.05$ .

**Figure 8. Proposed impact of cysLT-induced furin expression on airway remodeling.**

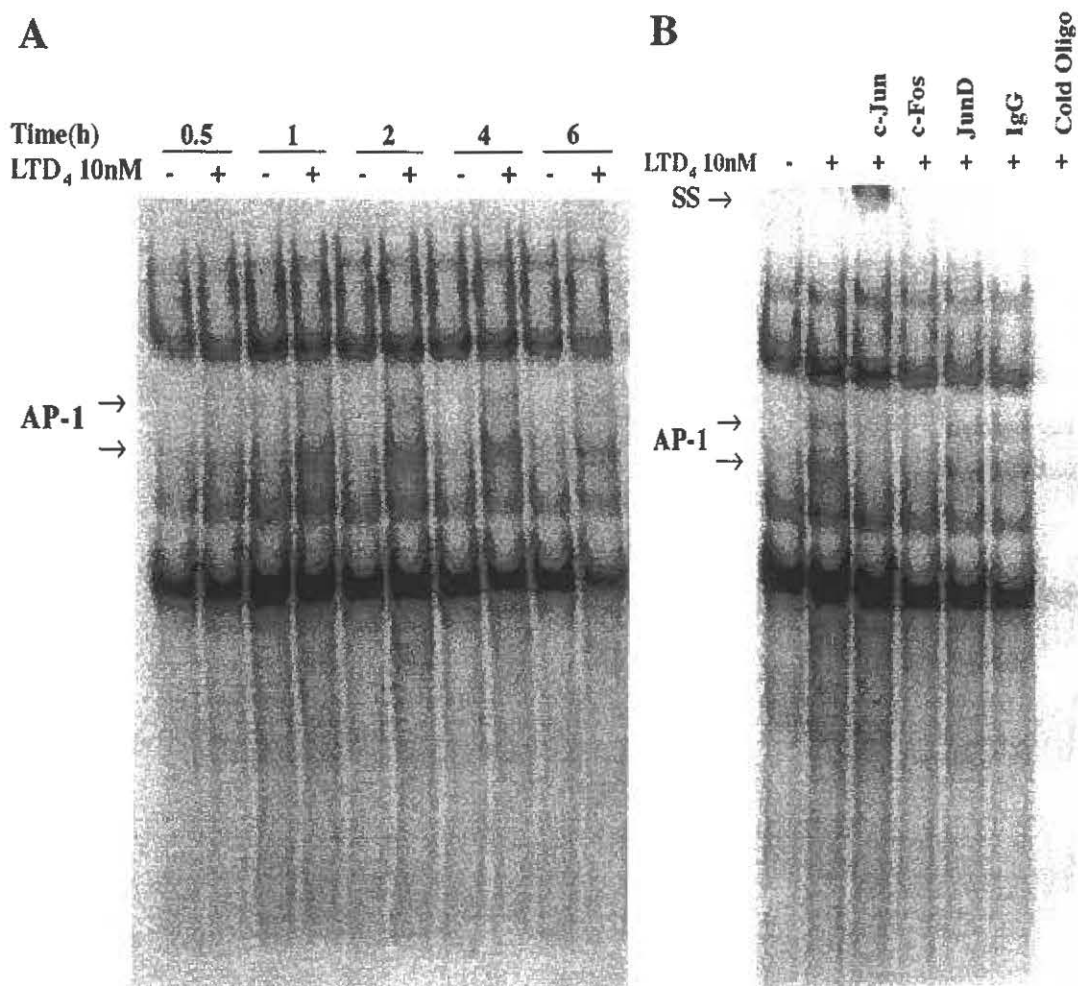
In this illustration, we propose a series of sequential events, in a context of airway remodeling, from inflammation and cysLT-induced upregulation of furin to substrate processing by furin and bioactivation of several fibrogenic/angiogenic factors leading to airway remodeling. Relevance to other pathological processes is not excluded.



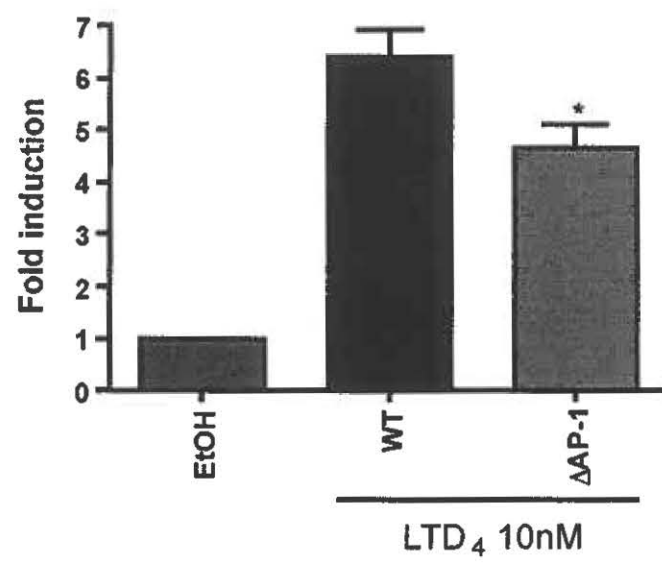
**Figure 1**  
Thompson et al



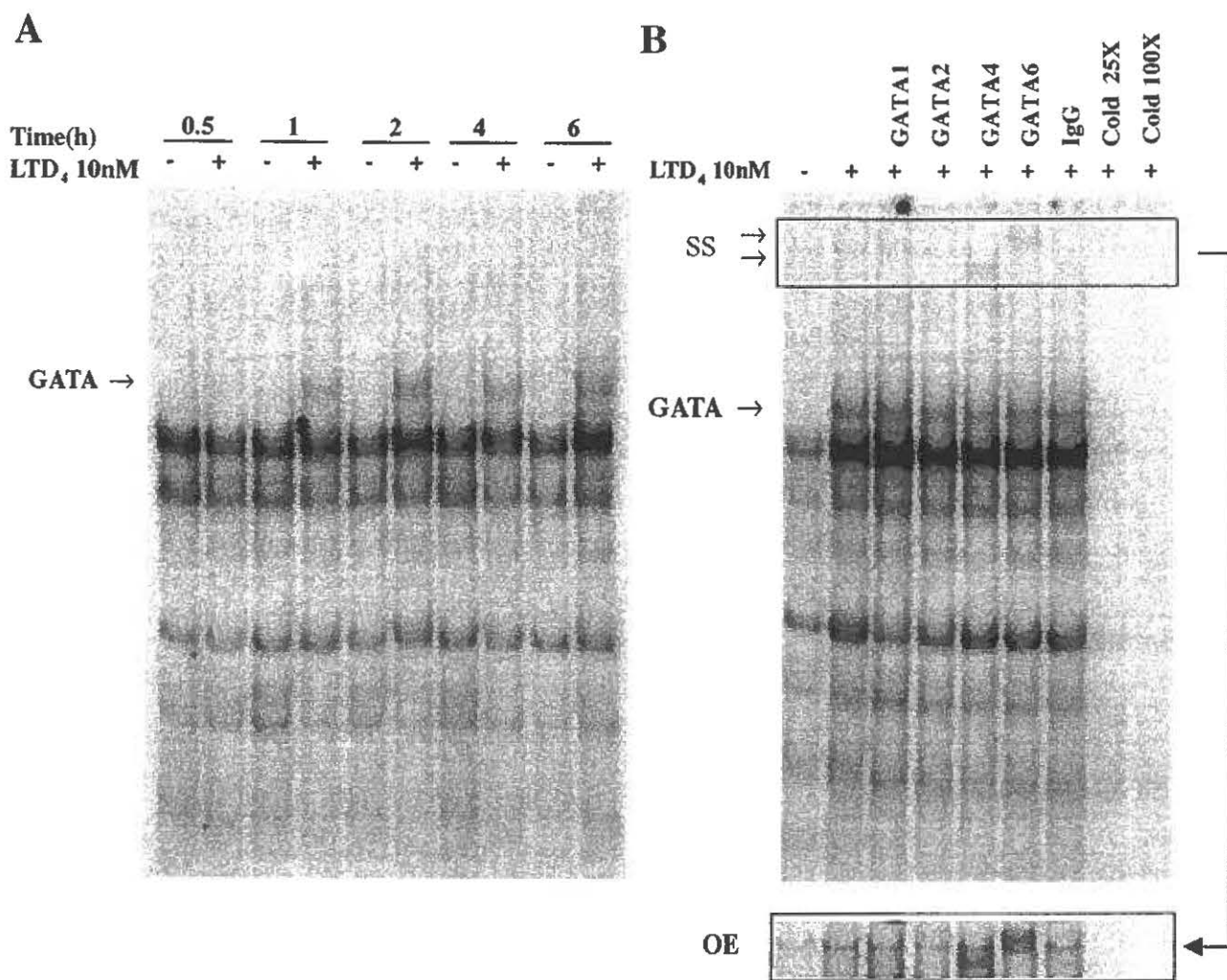
**Figure 2**  
Thompson et al



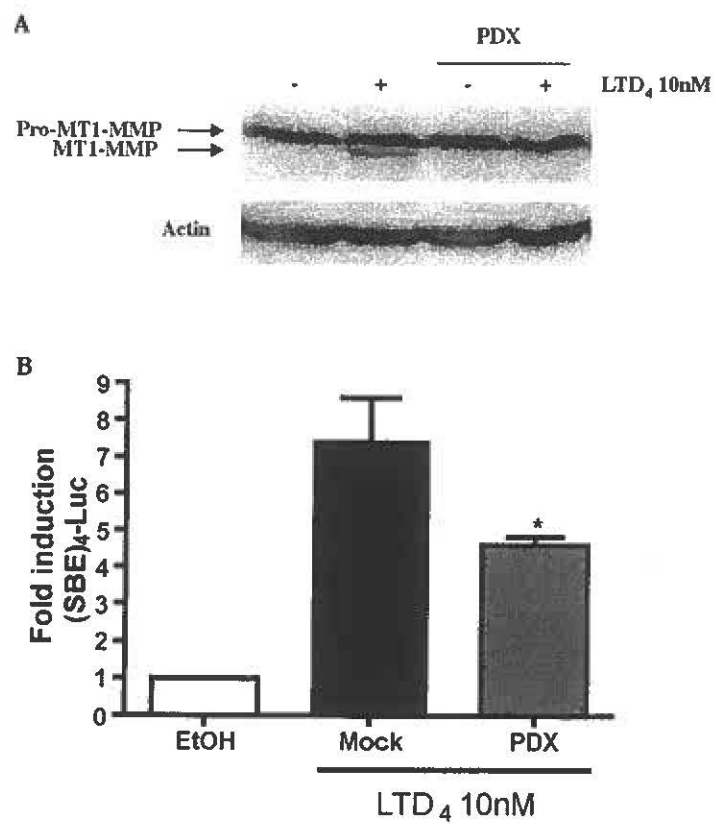
**Figure 3**  
Thompson et al



**Figure 4**  
Thompson et al

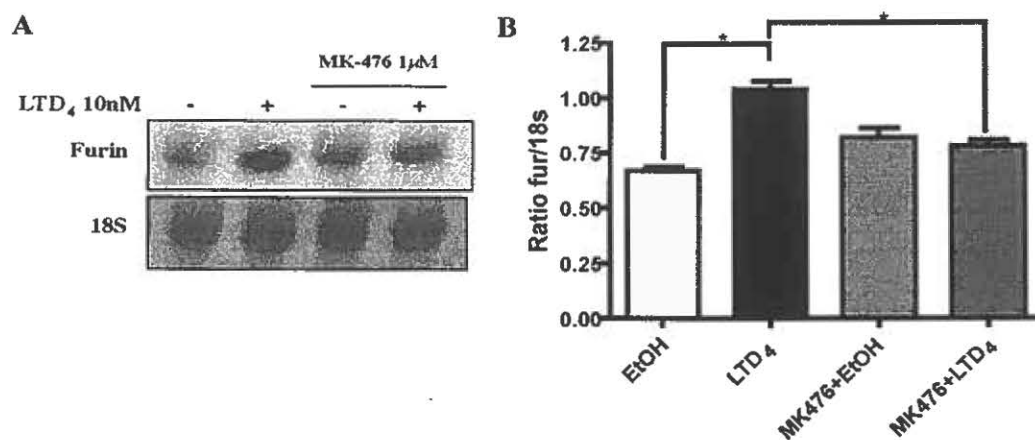


**Figure 5**  
Thompson et al

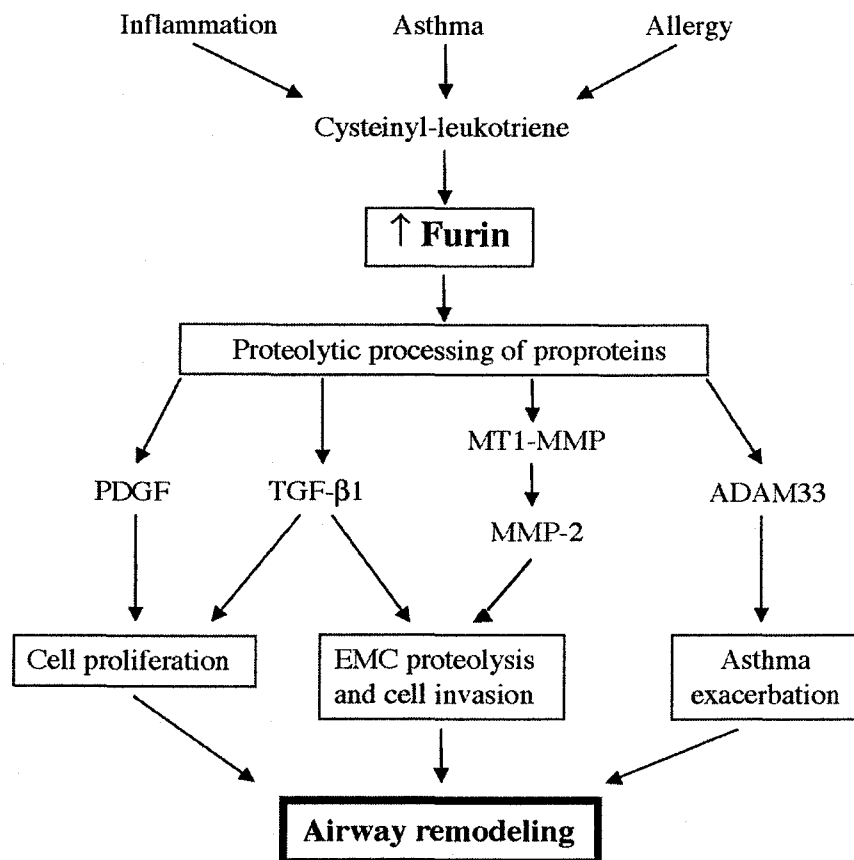


**Figure 6**  
Thompson et al





**Figure 7**  
Thompson et al



**Figure 8**  
**Thompson et al**

## REFERENCES

1. Devillier, P., N. Baccard, and C. Advenier. 1999. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. *Pharmacol Res* 40:15.
2. Lynch, K. R., G. P. O'Neill, Q. Liu, D. S. Im, N. Sawyer, K. M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D. J. Figueroa, Z. Zeng, B. M. Connolly, C. Bai, C. P. Austin, A. Chateaneuf, R. Stocco, G. M. Greig, S. Kargman, S. B. Hooks, E. Hosfield, D. L. Williams, Jr., A. W. Ford-Hutchinson, C. T. Caskey, and J. F. Evans. 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT<sub>1</sub> receptor. *Nature* 399:789.
3. Sarau, H. M., R. S. Ames, J. Chambers, C. Ellis, N. Elshourbagy, J. J. Foley, D. B. Schmidt, R. M. Muccitelli, O. Jenkins, P. R. Murdock, N. C. Herrity, W. Halsey, G. Sathe, A. I. Muir, P. Nuthulaganti, G. M. Dytko, P. T. Buckley, S. Wilson, D. J. Bergsma, and D. W. Hay. 1999. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol* 56:657.
4. Heise, C. E., B. F. O'Dowd, D. J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D. S. Im, R. Stocco, J. N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D. L. Williams, Jr., Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M. K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C. P. Austin, S. R. George, G. P. O'Neill, K. M. Metters, K. R. Lynch, and J. F. Evans. 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem* 275:30531.
5. Nothacker, H. P., Z. Wang, Y. Zhu, R. K. Reinscheid, S. H. Lin, and O. Civelli. 2000. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol* 58:1601.
6. Takasaki, J., M. Kamohara, M. Matsumoto, T. Saito, T. Sugimoto, T. Ohishi, H. Ishii, T. Ota, T. Nishikawa, Y. Kawai, Y. Masuho, T. Isogai, Y. Suzuki, S. Sugano, and K. Furuichi. 2000. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT<sub>2</sub> receptor. *Biochem*

*Biophys Res Commun* 274:316.

7. Espinosa, K., Y. Bosse, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2003. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol* 111:1032.
8. Panettieri, R. A., E. M. Tan, V. Ciocca, M. A. Luttmann, T. B. Leonard, and D. W. Hay. 1998. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:453.
9. Lex, C., A. Zacharasiewicz, D. N. Payne, N. M. Wilson, A. G. Nicholson, S. A. Kharitonov, P. J. Barnes, and A. Bush. 2006. Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res* 7:63.
10. Henderson, W. R., Jr., L. O. Tang, S. J. Chu, S. M. Tsao, G. K. Chiang, F. Jones, M. Jonas, C. Pae, H. Wang, and E. Y. Chi. 2002. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med* 165:108.
11. Levy, B. D., C. Bonnans, E. S. Silverman, L. J. Palmer, G. Marigowda, and E. Israel. 2005. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 172:824.
12. Green, S. A., M. P. Malice, W. Tanaka, C. A. Tozzi, and T. F. Reiss. 2004. Increase in urinary leukotriene LTE4 levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax* 59:100.
13. Spencer, D. A., A. P. Sampson, C. P. Green, J. F. Costello, P. J. Piper, and J. F. Price. 1992. Sputum cysteinyl-leukotriene levels correlate with the severity of pulmonary disease in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol* 12:90.
14. Zhou, A., G. Webb, X. Zhu, and D. F. Steiner. 1999. Proteolytic processing in the secretory pathway. *J Biol Chem* 274:20745.
15. Seidah, N. G., and M. Chretien. 1997. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol* 8:602.
16. Steiner, D. F. 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol* 2:31.
17. Ayoubi, T. A., J. W. Creemers, A. J. Roebroek, and W. J. Van de Ven. 1994.

- Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Biol Chem* 269:9298.
18. Laprise, M. H., F. Grondin, P. Cayer, P. P. McDonald, and C. M. Dubois. 2002. Furin gene (*fur*) regulation in differentiating human megakaryoblastic Dami cells: involvement of the proximal GATA recognition motif in the P1 promoter and impact on the maturation of furin substrates. *Blood* 100:3578.
  19. Blanchette, F., N. Rivard, P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano, and C. M. Dubois. 2001. Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem* 276:33986.
  20. McMahon, S., F. Grondin, P. P. McDonald, D. E. Richard, and C. M. Dubois. 2005. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem* 280:6561.
  21. Srour, N., A. Lebel, S. McMahon, I. Fournier, M. Fugere, R. Day, and C. M. Dubois. 2003. TACE/ADAM-17 maturation and activation of sheddase activity require proprotein convertase activity. *FEBS Lett* 554:275.
  22. Blanchette, F., R. Day, W. Dong, M. H. Laprise, and C. M. Dubois. 1997. TGFbeta1 regulates gene expression of its own converting enzyme furin. *J Clin Invest* 99:1974.
  23. Thompson, C., A. Cloutier, Y. Bosse, M. Thivierge, C. Le Gouill, P. Larivee, P. P. McDonald, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. CysLT1 Receptor Engagement Induces AP-1- and NF- $\kappa$ B-Dependent Interleukin-8 Expression. *Am J Respir Cell Mol Biol*.
  24. Jonk, L. J., S. Itoh, C. H. Heldin, P. ten Dijke, and W. Kruijer. 1998. Identification and functional characterization of a Smad binding element (SBE) in the JunB promoter that acts as a transforming growth factor-beta, activin, and bone morphogenetic protein-inducible enhancer. *J Biol Chem* 273:21145.
  25. Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2001. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol* 167:2855.

26. Chung, K. F. 2005. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc* 2:347.
27. Lazaar, A. L., and R. A. Panettieri, Jr. 2005. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol* 116:488.
28. Dubois, C. M., M. H. Laprise, F. Blanchette, L. E. Gentry, and R. Leduc. 1995. Processing of transforming growth factor beta 1 precursor by human furin convertase. *J Biol Chem* 270:10618.
29. Dubois, C. M., F. Blanchette, M. H. Laprise, R. Leduc, F. Grondin, and N. G. Seidah. 2001. Evidence that furin is an authentic transforming growth factor-beta1-converting enzyme. *Am J Pathol* 158:305.
30. Cochran, B. H., A. C. Reffel, and C. D. Stiles. 1983. Molecular cloning of gene sequences regulated by platelet-derived growth factor. *Cell* 33:939.
31. Collins, T., D. Ginsburg, J. M. Boss, S. H. Orkin, and J. S. Pober. 1985. Cultured human endothelial cells express platelet-derived growth factor B chain: cDNA cloning and structural analysis. *Nature* 316:748.
32. Duguay, S. J., W. M. Milewski, B. D. Young, K. Nakayama, and D. F. Steiner. 1997. Processing of wild-type and mutant proinsulin-like growth factor-IA by subtilisin-related proprotein convertases. *J Biol Chem* 272:6663.
33. Sato, H., T. Kinoshita, T. Takino, K. Nakayama, and M. Seiki. 1996. Activation of a recombinant membrane type 1-matrix metalloproteinase (MT1-MMP) by furin and its interaction with tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-2. *FEBS Lett* 393:101.
34. Yana, I., and S. J. Weiss. 2000. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell* 11:2387.
35. Labat, C., J. L. Ortiz, X. Norel, I. Gorenne, J. Verley, T. S. Abram, N. J. Cuthbert, S. R. Tudhope, P. Norman, P. Gardiner, and et al. 1992. A second cysteinyl leukotriene receptor in human lung. *J Pharmacol Exp Ther* 263:800.
36. Lewis, R. A., K. F. Austen, and R. J. Soberman. 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med* 323:645.

37. Drazen, J. M. 1998. Leukotrienes as mediators of airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med* 158:S193.
38. Ottino, P., J. He, T. W. Axelrad, and H. E. Bazan. 2005. PAF-induced furin and MT1-MMP expression is independent of MMP-2 activation in corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 46:487.
39. Blanchette, F., P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano, and C. M. Dubois. 2001. Involvement of Smads in TGFbeta1-induced furin (fur) transcription. *J Cell Physiol* 188:264.
40. Vlahopoulos, S., I. Boldogh, A. Casola, and A. R. Brasier. 1999. Nuclear factor-kappaB-dependent induction of interleukin-8 gene expression by tumor necrosis factor alpha: evidence for an antioxidant sensitive activating pathway distinct from nuclear translocation. *Blood* 94:1878.
41. Chen, L. C., B. K. Chen, J. M. Chang, and W. C. Chang. 2004. Essential role of c-Jun induction and coactivator p300 in epidermal growth factor-induced gene expression of cyclooxygenase-2 in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Biochim Biophys Acta* 1683:38.
42. Angel, P., K. Hattori, T. Smeal, and M. Karin. 1988. The jun proto-oncogene is positively autoregulated by its product, Jun/AP-1. *Cell* 55:875.
43. Kaminska, B., B. Pyrzynska, I. Ciechomska, and M. Wisniewska. 2000. Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars)* 60:395.
44. Molkenin, J. D. 2000. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem* 275:38949.
45. Morrissey, E. E., Z. Tang, K. Sigrist, M. M. Lu, F. Jiang, H. S. Ip, and M. S. Parmacek. 1998. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev* 12:3579.
46. Bruno, M. D., T. R. Korfhagen, C. Liu, E. E. Morrissey, and J. A. Whitsett. 2000. GATA-6 activates transcription of surfactant protein A. *J Biol Chem* 275:1043.
47. Shaw-White, J. R., M. D. Bruno, and J. A. Whitsett. 1999. GATA-6 activates transcription of thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem* 274:2658.

48. Charron, F., P. Paradis, O. Bronchain, G. Nemer, and M. Nemer. 1999. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol* 19:4355.
49. Sounni, N. E., M. Janssen, J. M. Foidart, and A. Noel. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol* 22:55.
50. Jeong, J. W., H. J. Cha, D. Y. Yu, M. Seiki, and K. W. Kim. 1999. Induction of membrane-type matrix metalloproteinase-1 stimulates angiogenic activities of bovine aortic endothelial cells. *Angiogenesis* 3:167.
51. Sasaki, K., T. Hattori, T. Fujisawa, K. Takahashi, H. Inoue, and M. Takigawa. 1998. Nitric oxide mediates interleukin-1-induced gene expression of matrix metalloproteinases and basic fibroblast growth factor in cultured rabbit articular chondrocytes. *J Biochem (Tokyo)* 123:431.
52. Duvernelle, C., V. Freund, and N. Frossard. 2003. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther* 16:181.
53. Bartram, U., and C. P. Speer. 2004. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest* 125:754.
54. Redington, A. E., J. Madden, A. J. Frew, R. Djukanovic, W. R. Roche, S. T. Holgate, and P. H. Howarth. 1997. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med* 156:642.
55. Batra, V., A. I. Musani, A. T. Hastie, S. Khurana, K. A. Carpenter, J. G. Zangrilli, and S. P. Peters. 2004. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy* 34:437.
56. Posthaus, H., C. M. Dubois, and E. Muller. 2003. Novel insights into cadherin processing by subtilisin-like convertases. *FEBS Lett* 536:203.
57. Lissitzky, J. C., J. Luis, J. S. Munzer, S. Benjannet, F. Parat, M. Chretien, J. Marvaldi, and N. G. Seidah. 2000. Endoproteolytic processing of integrin pro-alpha subunits involves the redundant function of furin and proprotein convertase



- (PC) 5A, but not paired basic amino acid converting enzyme (PACE) 4, PC5B or PC7. *Biochem J* 346 Pt 1:133.
58. Siegfried, G., A. Basak, J. A. Cromlish, S. Benjannet, J. Marcinkiewicz, M. Chretien, N. G. Seidah, and A. M. Khatib. 2003. The secretory proprotein convertases furin, PC5, and PC7 activate VEGF-C to induce tumorigenesis. *J Clin Invest* 111:1723.
  59. Van Eerdewegh, P., R. D. Little, J. Dupuis, R. G. Del Mastro, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Pandit, J. McKenny, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S. P. Manning, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Benchekroun, N. Capparell, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M. G. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K. M. Allen, A. Pedan, M. R. Danzig, S. P. Umland, R. W. Egan, F. M. Cuss, S. Rorke, J. B. Clough, J. W. Holloway, S. T. Holgate, and T. P. Keith. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature* 418:426.
  60. Holgate, S. T., D. E. Davies, S. Rorke, J. Cakebread, G. Murphy, R. M. Powell, and J. W. Holloway. 2004. ADAM 33 and its association with airway remodeling and hyperresponsiveness in asthma. *Clin Rev Allergy Immunol* 27:23.
  61. Garlisi, C. G., J. Zou, K. E. Devito, F. Tian, F. X. Zhu, J. Liu, H. Shah, Y. Wan, M. Motasim Billah, R. W. Egan, and S. P. Umland. 2003. Human ADAM33: protein maturation and localization. *Biochem Biophys Res Commun* 301:35.

## DISCUSSION

Les cystéinyl-leucotriènes sont impliqués dans plusieurs processus inflammatoires. Leur participation dans l'asthme et l'allergie a fait l'objet de nombreuses études et est désormais sans équivoque. Les effets engendrés par les cysLT sont le reflet de l'activation d'au moins deux récepteurs, soit le CysLT1 et le CysLT2. Avec l'arrivée des antagonistes classiques, le potentiel physio-pathologique du récepteur CysLT1 a été mis en évidence. Bien que ces antagonistes soient largement utilisés en clinique, maintes fonctions du CysLT1 demeurent encore inconnues. De plus, l'efficacité des antagonistes suggère une grande répercussion des cysLT sur d'autres facteurs de la pathogénèse asthmatique. En ce qui concerne le récepteur CysLT2, tout reste à découvrir. Ses rôles ainsi que sa signalisation n'ont toujours pas été élucidés. L'absence d'antagoniste spécifique pour ce récepteur augmente, en effet, la complexité de son étude.

Puisque plusieurs cellules expriment de façon simultanée les récepteurs CysLT1 et CysLT2, il devient difficile de bien faire la distribution des rôles. Nous avons par conséquent généré des cellules qui expriment soit uniquement le CysLT1 (293LT1) ou uniquement le CysLT2 (293LT2). Ces modèles nous ont ainsi permis d'étudier diverses fonctions, de même que la signalisation propre à chacun des récepteurs.

### *Modulation des chimiokines par les CysLT*

Nous nous sommes d'abord intéressé à l'inflammation pulmonaire, qui est l'une des caractéristiques importantes de la phase tardive de l'asthme. Elle résulte principalement d'une infiltration cellulaire dans les voies aériennes (Metzger et al., 1985). Malgré les évidences d'une participation des cysLT dans les processus inflammatoires, les connaissances actuelles ne nous permettent pas de bien établir quels sont les mécanismes de régulation orchestrés par ces lipides. Certes, les cysLT ont un effet chimiotactique sur les éosinophiles (Laitinen et al., 1993; Underwood et al., 1996). Ces observations sont confirmées par la réduction des éosinophiles dans les voies aériennes à la suite d'un traitement avec les antagonistes du CysLT1 (Becler et al., 2002;

Lee et al., 2000; Minoguchi et al., 2002). Toutefois, on ne peut établir si cette chimiotaxie s'effectue de façon directe ou indirecte.

La migration des cellules inflammatoires s'effectue généralement sous la gouverne des chimiokines. La sécrétion de ces chimiokines est principalement induite par des signaux rapides lors de réponses immunes innées (exemples : LPS, TNF, IL-1) (Garcia-Zepeda et al., 1996; Proost et al., 1996). Une production rapide de chimiokines permet d'établir un lien important entre la réponse immune innée et l'immunité adaptative (Zimmermann et al., 2003). En contexte asthmatique, ce sont majoritairement ces petites molécules qui permettent d'établir le lien entre la phase précoce (aiguë) et la phase tardive, dite d'infiltration cellulaire.

Dans les chapitres I et II, nous nous sommes attardé à l'étude de la modulation de la production de chimiokines par les cysLT. Ces derniers étant produits très rapidement (45 sec) durant la phase aiguë par les mastocytes et les basophiles (Leff, 2001), ils constituent donc des joueurs potentiels pour établir, via la libération de chimiokines, le lien entre la phase précoce et la phase tardive. Il est à noter que, dans les poumons, les chimiokines sont sécrétées par les cellules résidentes et/ou par les cellules inflammatoires qui ont migré dans les voies aériennes (Hamid et al., 2003; Hamid and Minshall, 2000; Howarth et al., 2004; Lazaar and Panettieri, 2001). D'ailleurs, les cellules infiltrantes, notamment les éosinophiles, représentent également des sources considérables de cysLT dans le poumon (Laviolette et al., 1995; Taniguchi et al., 1985), qui permettent ainsi d'amplifier la réponse inflammatoire.

Qui plus est, soulignons que des concentrations élevées de la chimiokine IL-8 ont été rapportées dans les lavages bronchoalvéolaires et dans les expectorations induites de patients asthmatiques (Gibson et al., 2001; Ordonez et al., 2000). L'IL-8 représente un puissant activateur et un agent chimiotactique pour les neutrophiles (Harada et al., 1994). De ce fait, il promeut l'inflammation dans des pathologies, telles que l'asthme sévère (Gibson et al., 2001; Harada et al., 1994; Ordonez et al., 2000) le MPOC (Beeh et al., 2003; Pesci et al., 1998) et la fibrose kystique (McGarvey et al., 2002). D'un autre côté,

on note aussi l'augmentation des cysLT dans l'asthme sévère (Lam et al., 1988; Pavord et al., 1999; Rabinovitch et al., 2006a; Rabinovitch et al., 2006b). En jumelant ces données, nous avons alors entrevu la possibilité que ces expressions pouvaient être reliées. Au cours de nos expérimentations, il s'est effectivement avéré que les cysLT avaient la capacité de réguler la production d'IL-8.

Dans un premier temps, nous avons observé une forte induction de la production d'IL-8 chez les cellules 293LT1 et 293LT2. Nous constatons dès ce moment que la sécrétion des chimiokines était possible par l'intermédiaire des deux récepteurs spécifiques des cysLT. Les résultats ont ensuite été confirmés chez la lignée monocyttaire THP-1 et chez les cellules dendritiques dérivées de monocytes. L'inhibition par les antagonistes classiques a aussi permis de confirmer l'implication du récepteur CysLT1 chez ces mêmes cellules. Afin d'étudier le récepteur CysLT2 en conditions endogènes, nous avons utilisé les cellules endothéliales dérivées de cordons ombilicaux (HUVEC). Comme mentionné dans l'introduction, la réponse des HUVEC aux cysLT est le résultat de l'activation du récepteur CysLT2; en effet, cette réponse n'est pas affectée par les antagonistes du CysLT1 (Lotzer et al., 2003). Nos résultats indiquent une production rapide (2h) de l'ARNm de l'IL-8 en réponse au LTC<sub>4</sub> chez les HUVEC.

Dans la présente thèse, nous avons donc démontré que les cysLT n'agissent pas seulement en tant que facteurs chimiotactiques directs, mais qu'ils peuvent également prendre une part fondamentale dans le recrutement de plusieurs types cellulaires via la production de chimiokines. Les cellules endothéliales, qui entraînent une production très rapide de chimiokines par les cysLT, pourraient ainsi participer à l'établissement de l'environnement proinflammatoire dans l'asthme. Les cellules infiltrantes pourraient, quant à elles, maintenir ou accentuer l'inflammation par la production de chimiokines en réponse aux cysLT.

Chez les asthmatiques, les cellules musculaires lisses bronchiques (BSMC) sont d'excellents producteurs de chimiokines, et tout particulièrement d'IL-8. Ces cellules expriment également le récepteur CysLT1 et CysLT2 (Amrani et al., 2001; Espinosa et

al., 2003). Elles sont en outre responsables du bronchospasme en réponse au cysLT (Bisgaard and Groth, ; Drazen, 1998; Smith et al., 1990). Selon toute vraisemblance, les BSMC devaient donc être une excellente source d'IL-8 en réponse au cysLT. C'est à ce propos que nous avons étudié la production d'IL-8 à la suite d'une stimulation avec les cysLT chez les BSMC. Contre toute attente, les résultats se sont avérés des plus décevants : l'induction était à peine perceptible. Les témoins positifs (TNF- $\alpha$  et IL-1 $\beta$ ) généraient, quant à eux, des quantités impressionnantes d'IL-8. En fait, l'absence de réponse aux cysLT par ces cellules qui sont, en théorie, la cible par excellence des cysLT, est très difficile à interpréter. Les BSMC, avec lesquels nous avons effectué nos expériences, sont des cellules musculaires lisses bronchiques primaires, qui proviennent de la compagnie Clonetics; cette compagnie se spécialise dans la culture cellulaire. Pour expliquer ce piètre résultat, nous posons comme hypothèse le faible niveau d'expression des récepteurs CysLT1 sur les BSMC. D'ailleurs des expériences de cytométrie de flux effectuées dans notre laboratoire démontrent une faible expression du CysLT1 chez les BSMC, ce qui concorde avec l'hypothèse proposée. Cette chute d'expression des récepteurs CysLT est probablement causée par un trop grand nombre de passages cellulaires. En effet, les cellules sont reçues au passage 2, et à la suite de l'expansion cellulaire, les expériences sont effectuées au passage 4. Si l'on compare avec les HUVEC en culture primaire, celles-ci doivent être utilisées avant le 2<sup>ème</sup> passage lors des expériences accomplies avec les leucotriènes (Lotzer et al., 2003). Malgré les résultats non convaincants obtenus avec les BSMC, il ne faut surtout pas négliger le potentiel, chez les asthmatiques, de production des chimiokines par ces cellules en réponse aux cysLT.

En tenant compte des données accumulées aux chapitres I et II, nous pouvons maintenant suggérer un rôle patho-physiologique à nos observations. Ainsi, la signification clinique de nos études sur l'IL-8 se retrouve dans l'association entre les cysLT, les chimiokines, les éosinophiles et les neutrophiles. À ce jour, la littérature relie principalement les cysLT à la migration des éosinophiles (Laitinen et al., 1993; Underwood et al., 1996). Certes, la majorité des études ont été effectuées en contexte d'asthme allergique, qui implique une inflammation éosinophilique. Toutefois, une

observation récente vient changer la perspective sur le recrutement des éosinophiles dans les voies aériennes. Une étude rapporte effectivement que les neutrophiles sont essentiels à la migration des éosinophiles dans les poumons (Kikuchi et al., 2006). À partir de ces observations, nous proposons donc le mécanisme suivant : l'augmentation de l'IL-8 par les cysLT permettrait l'activation et le recrutement des neutrophiles, qui seraient nécessaires à l'infiltration des éosinophiles dans les parois aériennes. Par ailleurs, notons que plus la pathologie asthmatique augmente en sévérité, plus il y a d'implication des neutrophiles (Holgate et al., 2006). À cet effet, la contribution de l'IL-8 et des neutrophiles dans les cas plus sévère d'asthme est déjà bien documentée. Nous croyons que cette augmentation pourrait être due aux effets des cysLT, qui sont eux aussi augmentés dans les cas plus sévères d'asthme (Rabinovitch et al., 2006b). Soulignons également que le montelukast a des effets bénéfiques chez les patients atteints de fibrose kystique (Schmitt-Grohe and Zielen, 2005). Selon ces travaux, le montelukast entraîne une diminution d'expression de l'IL-8 ce qui conduit à une réduction de neutrophiles et d'éosinophiles. Ceci vient appuyer nos résultats sur l'induction de chimiokines par les cysLT.

Ajoutons également que plusieurs autres chimiokines participent à la pathogénèse de l'asthme. Par exemple, une augmentation de l'expression de MCP-1 est retrouvée dans les tissus bronchiques et les lavages bronchoalvéolaires chez des patients asthmatiques (Holgate et al., 1997; Sousa et al., 1994). Le blocage du MCP-1 (CCL-2) chez les souris diminue l'infiltration leucocytaire dans les poumons ainsi que l'hyper-réactivité bronchique (Gonzalo et al., 1998). À ce propos, nous avons mentionné au chapitre I que le LTD<sub>4</sub> avait la capacité d'induire la production de MCP-1 chez les cellules THP-1, un phénomène qui est inhibé par les antagonistes classiques (résultats non présentés). Woszczek et ses collaborateurs ont récemment publié des résultats similaires, démontrant une augmentation du CCL-2 chez les THP-1 préalablement traités avec l'IL-4 (Woszczek et al., 2005). Ils démontrent également une inhibition complète de l'augmentation de MCP-1 par les antagonistes classiques du CysLT1. Les mécanismes de signalisation ne sont cependant pas rapportés. Ils suggèrent toutefois une synergie entre l'activation de STAT6 par l'IL-4 et une voie de signalisation induite par les cysLT. Pour notre part, nous discuterons ultérieurement de nos études de signalisation.

Les fonctions auxquelles s'associent les cysLT ne se limitent pas à l'asthme et à l'allergie. Plusieurs travaux suggèrent la participation des leucotriènes dans les maladies cardiovasculaires, dont l'athérosclérose et l'ischémie cérébrale. À ce titre, une augmentation de la production de cysLT est démontrée chez des modèles ischémiques, et ce surtout après la réperfusion (Ciceri et al., 2001; Mabe et al., 1990; Minamisawa et al., 1988; Moskowitz et al., 1984; Ohtsuki et al., 1995). De plus, très récemment, une expression à la hausse du récepteur CysLT1 a été rapportée à la suite d'une ischémie cérébrale chez le rat (Fang et al., 2006). L'activation des neutrophiles est une caractéristique importante de la réaction inflammatoire aiguë lors de la réperfusion post-ischémique (Rabb et al., 1997). Les neutrophiles sont en effet responsables de dommages importants après la réperfusion (Reiter et al., 2001; Winterbourn et al., 2000). D'ailleurs, chez des modèles d'ischémie cervicale (Chu et al., 2006), du foie (Sener et al., 2006) et du rein (Sener et al., 2005a), le montelukast entraîne une inhibition du recrutement des neutrophiles au site d'inflammation. Les mécanismes sous-jacents demeurent toutefois inconnus. Toutes ces études permettent néanmoins d'établir une corrélation intéressante avec nos résultats obtenus aux chapitres I et II. Par exemple, ces phénomènes impliquent une augmentation de la production de cysLT qui, via le récepteur CysLT1 (ou CysLT2), entraîne une sécrétion rapide d'IL-8, ce qui permet ensuite l'attraction des neutrophiles au site inflammatoire. De plus, chez un modèle d'inflammation du derme, le montelukast produit des effets similaires sur l'attraction des neutrophiles aux sites inflammatoires (Sener et al., 2005b).

Bien d'autres données de la littérature associent les dérivés de la 5-LO avec les maladies cardiovasculaires. Chez les souris déficientes en 5-LO et ApoE, il y a diminution de l'incidence des anévrismes aortiques (Zhao et al., 2004). La cascade de la 5-LO pourrait donc affecter le remodelage des parois artérielles (Lotzer et al., 2005). De plus, l'absence de 5-LO inhibe l'augmentation de MIP-1 $\alpha$  chez les souris hyperlipidémiques (Zhao et al., 2004). Ces études suggèrent donc un lien entre la 5-LO, l'hyperlipidémie et la production de chimiokines inflammatoires. L'augmentation de LTE<sub>4</sub> urinaire a également été démontrée à la suite d'épisodes d'angine instable et d'infarctus du myocarde (Carry et al., 1992), de même que dans les maladies artérielles

coronariennes (Allen et al., 1993). Lotzer et ses collaborateurs proposent quant à eux une implication du récepteur CysLT2 dans l'inflammation et l'athérogénèse (Lotzer et al., 2003). À cet effet, une publication récente révèle une augmentation de l'expression du récepteur CysLT2 dans les plaques carotidiennes chez des souris susceptibles à l'athérocclérose (ApoE<sup>-/-</sup>) (Qiu et al., 2006).

Nos constats quant à l'augmentation de la production de chimiokines par les cysLT chez les cellules endothéliales proposent un nouveau mécanisme par lequel les cysLT pourraient participer aux maladies cardiovasculaires. Les cellules endothéliales disposent d'une position stratégique pour établir des interactions avec les neutrophiles et les plaquettes. D'ailleurs, l'interaction entre les neutrophiles activés et les cellules endothéliales au site inflammatoire est l'une des situations idéales pour la biosynthèse transcellulaire des leucotriènes (Sala et al., 2000). En effet, cette interaction cellule-cellule contrôle la production de leucotriènes (Marcus et al., 1982), ce qui contribue à l'altération du tonus artériel et à l'œdème périvasculaire (Sala et al., 1996; Sala et al., 2000; Sala et al., 1993). Cette surproduction de cysLT pourrait ainsi agir de façon autocrine sur la production de chimiokines par les cellules endothéliales. La situation résulte en une boucle d'activation: IL-8 → neutrophiles → LTA<sub>4</sub> → endothélium → LTC<sub>4</sub> synthase → LTC<sub>4</sub> → endothélium (CysLT2) → IL-8/MCP-1. Selon toute vraisemblance, il y a création d'inflammation cardiovasculaire par le recrutement de leucocytes dans les parois artérielles. De plus, l'activation des cellules endothéliales par les cysLT augmente la perméabilité vasculaire (Dahlen et al., 1981), l'expression de la P-sélectine (Pedersen et al., 1997) (facilitant le recrutement des neutrophiles), la sécrétion du facteur von Willebrand (Datta et al., 1995) et la synthèse de PAF (McIntyre et al.). Nos résultats démontrent également une induction de l'expression de l'ARNm de MCP-1 chez les cellules 293LT2. Le MCP-1 (CCL-2) est une chimiokine très importante dans le recrutement des monocytes au site d'inflammation dans l'athérosclérose (Gu et al., 1998).

Il est également intéressant de noter que la transcription de l'IL-8 chez les cellules THP-1 et les cellules dendritiques est complètement inhibée par le montelukast, et ce malgré la présence du CysLT2 chez ces cellules. Comme nous l'avons démontré, du moins chez les cellules 293LT2 et les HUVEC, les récepteurs CysLT2 induisent une forte production de l'IL-8 à la suite d'une stimulation par les cysLT. Il est, par conséquent,



difficilement concevable qu'un antagoniste spécifique pour le CysLT1 puisse inhiber totalement la réponse au cysLT chez les THP-1 et les cellules dendritiques dérivées de monocytes. Deux hypothèses peuvent alors être proposées : (1) une inhibition non-spécifique au CysLT1 par les antagonistes classiques du CysLT1; (2) la signalisation du CysLT2 est dépendante du CysLT1 chez les lignées hématopoïétiques.

Notons à ce sujet que deux groupes japonais ont rapporté une inhibition non-spécifique de la voie de signalisation NF- $\kappa$ B par le pranlukast et le montelukast, deux antagonistes spécifiques du CysLT1 (Ichiyama et al., 2003; Ishinaga et al., 2005; Tomari et al., 2003). La concentration d'antagonistes utilisée était toutefois plutôt élevée (10 $\mu$ M). L'observation demeure néanmoins intéressante et non négligeable. Une publication très récente par Langlois et collaborateurs rapporte également des inhibitions non spécifiques par les antagonistes du CysLT1 lors de la production de protéases (Langlois et al., 2006). D'autre part, l'équipe du Dr Joshua A. Boyce a observé, chez les souris déficientes en CysLT1, que le récepteur CysLT2 ne pouvait générer d'influx calcique en réponse aux cysLT (résultats non-publiés). La signalisation du récepteur CysLT2 serait donc dépendante de la présence du CysLT1 chez certaines cellules. D'autres travaux seront toutefois nécessaires pour expliquer ces mécanismes.

Les interrogations au sujet du CysLT2, nous le constatons, restent nombreuses. Qui plus est, la venue d'antagonistes spécifiques pour ce récepteur se fait de plus en plus attendre. Le CysLT2 se retrouve avec un potentiel intéressant, lui qui, jusqu'à maintenant, était plutôt négligé. Bref, la découverte d'un antagoniste spécifique au CysLT2 est nécessaire pour bien comprendre les mécanismes des cysLT chez l'humain. Nous savons désormais que les éosinophiles et les macrophages alvéolaires, qui sont des joueurs importants de l'inflammation pulmonaire, expriment beaucoup de CysLT2 (Heise et al., 2000). Il ne faut donc pas négliger le rôle potentiel du CysLT2 dans la pathogénèse de l'asthme et l'allergie, sans oublier non plus le potentiel du CysLT2 dans les maladies cardiovasculaires. Finalement, des antagonistes qui bloquent à la fois le CysLT1 et le CysLT2 pourraient s'avérer encore plus bénéfiques que les antagonistes classiques pour contrôler l'asthme.

### *La signalisation des récepteurs CysLT*

Une partie importante de cette thèse est consacrée à l'étude de la signalisation des récepteurs CysLT. Malgré l'étendue des recherches sur les cysLT, les mécanismes de signalisation induits par le récepteur CysLT1 sont encore peu définis, ce à quoi nous avons tenté de remédier. Nous avons d'abord identifié que la régulation de l'expression d'IL-8 en réponse au LTD<sub>4</sub> était de nature transcriptionnelle. Le promoteur proximal de l'IL-8 demeure principalement sous le contrôle de trois facteurs de transcription, soit le NF- $\kappa$ B, NF-IL-6 et AP-1 (Hoffmann et al., 2002). NF- $\kappa$ B est un facteur de transcription clé dans les processus inflammatoires (Senftleben and Karin, 2002). De plus, une association entre la surexpression de NF- $\kappa$ B et l'asthme a été rapportée (Gagliardo et al., 2003; Hart et al., 1998). Plusieurs études sur la signalisation des RCPG démontrent leur capacité à induire une activation de la voie NF- $\kappa$ B (Brach et al., 1992; Weyrich et al., 1995). Souvenons-nous que dans le premier chapitre, nous avons observé, à l'aide de différentes approches expérimentales, une activation des voies de signalisation NF- $\kappa$ B et AP-1 à la suite de la stimulation du CysLT1. En effet, le récepteur CysLT1 utilise la voie classique de NF- $\kappa$ B et mène à la formation de complexes composés des sous-unités p50 et p65.

En ce qui concerne le facteur de transcription AP-1, ces différents complexes protéiques provoquent plusieurs phénomènes physiologiques, dont l'apoptose et l'activation du cycle cellulaire (prolifération) (Eferl and Wagner, 2003; Kaminska et al., 2000). Des études effectuées à partir de souris déficientes en AP-1 ont révélé une implication de ce facteur dans l'asthme (Desmet et al., 2005). De plus, AP-1 se trouve augmenté en contexte asthmatique sévère (Christodoulopoulos et al., 2000). La régulation de AP-1 s'effectue à trois niveaux soit : par la composition de ses complexes; par la disponibilité de ses sous-unités; par régulation post-traductionnelle (Kaminska et al., 2000). Cette dernière étape consiste en la phosphorylation des sous-unités AP-1. Nos résultats démontrent clairement que les cysLT agissent à tous les niveaux de régulation

de AP-1. Il s'agit ici de la première démonstration de l'augmentation de l'expression de c-fos et c-jun, de la formation d'un complexe c-Jun/c-Fos et de la phosphorylation de c-Jun par le CysLT1. Bien que ces résultats apportent des indications novatrices, des expériences supplémentaires sont nécessaires afin d'étudier la signalisation conduisant à la production des sous-unités c-fos et c-jun.

Ces résultats obtenus suggèrent ainsi la participation des cysLT dans le phénomène de surexpression de NF- $\kappa$ B et AP-1 dans l'asthme. Nous proposons ainsi que le blocage du récepteur CysLT1, par les antagonistes classiques, pourrait réduire l'inflammation pulmonaire en inhibant l'expression des diverses cytokines et chimiokines induites par ces facteurs de transcription.

Dans le deuxième chapitre, nous avons abordé l'étude du récepteur CysLT2. Aucune étude de signalisation sur le CysLT2 n'avait encore été rapportée avant que nous n'entamions cette analyse. Nos résultats ont d'abord démontré une signalisation plutôt similaire à celle du récepteur CysLT1. C'est donc dire que le CysLT2 induit lui aussi fortement les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et AP-1, ainsi que la formation des complexes p50/p65 et c-Jun/c-Fos. Toutefois, contrairement au CysLT1, le CysLT2 semble également impliquer de façon partielle le facteur de transcription C/EBP.

Lors de nos travaux, les voies de signalisation concernant le récepteur CysLT2 ont été abordées plus en détail. Nous savons que, normalement, la signalisation de AP-1 se retrouve sous l'influence des différents membres des MAPKinases (Karin, 1995; Karin et al., 1997). C'est pourquoi nous avons d'abord pris pour cibles ces protéines. Nos résultats ont effectivement démontré la phosphorylation des protéines p38, Erk1/2 et JNK à la suite de la stimulation du CysLT2 (résultats non présentés). De plus, gardons bien en mémoire que la formation du complexe c-Jun/c-Fos par le LTC<sub>4</sub> coïncide avec la phosphorylation de la sous-unité c-Jun. Nous connaissons déjà l'implication de la protéine kinase JNK dans la phosphorylation de c-Jun (Hibi et al., 1993; Karin, 1995; Minden et al., 1994). Contre toute attente, l'activation de JNK ne semble pas responsable de la phosphorylation de c-Jun dans la signalisation du CysLT2. Le SP600125, un inhibiteur de JNK kinase, inhibe la phosphorylation de JNK, mais n'inhibe pas la

phosphorylation de c-Jun. Le SP600125 est un inhibiteur qui bloque le site de liaison à l'ATP. Cependant, aux concentrations utilisées, il a également la capacité de bloquer la kinase MKK4, ce qui pourrait expliquer l'inhibition de la phosphorylation de JNK. De plus, nous avons observé qu'aucune MAPkinase ne participe à la transactivation de l'IL-8 par le CysLT2. Nos observations se basent toutefois sur l'utilisation d'inhibiteurs chimiques. Ainsi, d'autres MAPKinases (différents isoformes) qui ne sont pas inhibées par ces inhibiteurs pourraient être impliquées dans la signalisation du CysLT2.

Étonnamment, la phosphorylation de c-Jun induite par le CysLT2 semble plutôt être en aval de la protéine kinase (PK)Cδ. C'est en observant l'implication des PKC dans la régulation de l'IL-8 par les RCPG que nous avons été incités à l'étude de ces kinases (Cummings et al., 2004). Ce que nous avons entre autres découvert, c'est que la transactivation de l'IL-8 par le CysLT2 est inhibée par le rottlerin (un inhibiteur de la PKCδ) et le dominant négatif de PKCδ. Le rottlerin bloque également la phosphorylation de c-Jun et la liaison à l'ADN de AP-1. Cependant, nos résultats divergent quelque peu de la littérature, quant à la position de la PKCδ dans la signalisation des RCPG. Ainsi, la PKCδ est rapportée comme une protéine en amont de NF-κB plutôt que d'AP-1 à la suite de l'activation de différents RCPG (Cummings et al., 2004; Koon et al., 2005). La sérine 63 de c-Jun, qui est suivie d'une proline, constitue plutôt un site de phosphorylation pour les MAP Kinases et les kinases dépendantes des cyclines. D'autre part, une étude à l'aide de PKC constitutivement actives a démontré que ces PKC ne pouvaient phosphoryler directement la portion 5-89aa de c-Jun (Adler et al., 1992). Nous suggérons par conséquent que, à la suite de l'activation du récepteur CysLT2, la PKCδ agit de façon indirecte, c'est-à-dire par l'intermédiaire de l'activation d'une autre kinase capable de phosphoryler c-Jun. Comme les résultats ont été obtenus à l'aide d'inhibiteurs pharmacologiques, un blocage non-spécifique d'une autre kinase n'est pas écarté. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de confirmer cette hypothèse et d'identifier la kinase responsable de la phosphorylation de c-Jun en réponse au LTC<sub>4</sub>. Par ailleurs, des données de Thodetti et ses collaborateurs sur le récepteur CysLT1 ont démontré l'activation de protéines de la famille des PKC, dont la PKCα, δ, et ε chez des cellules épithéliales intestinales (Thodetti et al., 2001).

Revenons maintenant sur les éléments situés en amont de l'activation NF- $\kappa$ B induite par le CysLT<sub>2</sub>. Plusieurs études confirment l'implication de différentes PKC dans la signalisation qui mène à la voie NF- $\kappa$ B. Nos résultats suggèrent d'ailleurs la participation d'au moins une PKC. Nous n'avons cependant pas encore identifié spécifiquement la ou les PKC en cause. Nos suggestions reposent sur un inhibiteur non spécifique des PKC, soit le GF109203X. Ce dernier inhibe la phosphorylation de p65, ainsi que la liaison de protéines nucléaires à l'ADN de NF- $\kappa$ B induite par les cysLT. Des données obtenues à l'aide de dominants négatifs des PKC nous révèlent la participation de la PKC $\delta$ ,  $\epsilon$  et  $\zeta$  dans la transactivation d'IL-8. Nous avons déjà identifié la PKC $\delta$  en amont de AP-1. En ce qui a trait à la PKC $\epsilon$ , des études récentes ont démontré son potentiel de régulation de NF- $\kappa$ B (Chen et al., 2005). En effet, elle est impliquée dans l'activation de NF- $\kappa$ B induite par le fMLP. Finalement, pour ce qui est de la PKC $\zeta$ , plusieurs publications suggèrent qu'elle détiendrait un rôle dans la voie d'activation de NF- $\kappa$ B; il y est rapporté que la PKC $\zeta$  phosphoryle la sous-unité p65 et IKK $\beta$  (Anrather et al., 1999; Duran et al., 2003; Lallena et al., 1999). De plus, une surexpression de PKC $\zeta$  chez les cellules NIH 3T3 induit une translocation permanente de la forme active de NF- $\kappa$ B dans le noyau (Diaz-Meco et al., 1993). La PKC $\epsilon$  et la PKC $\zeta$  sont donc deux candidates potentielles de l'activation de NF- $\kappa$ B par le CysLT<sub>2</sub>. Mentionnons toutefois que la PKC $\epsilon$  fait également partie des substrats potentiels de la PKC $\delta$  (Diaz-Meco et al., 1993). Par conséquent, elle pourrait tout aussi bien se retrouver dans la voie de signalisation AP-1.

Dans un même ordre d'idée, des résultats préliminaires nous démontrent que le LTC<sub>4</sub> a la capacité d'induire fortement la phosphorylation de la protéine kinase (PK)D (résultats non présentés). La PKD, aussi connue sous le nom PKC $\mu$ , s'avère également un substrat des PKC (Rykx et al., 2003; Waldron and Rozengurt, 2003). Enfin, il semblerait y avoir implication de plusieurs PKC dans la signalisation du récepteur CysLT<sub>2</sub> menant à la transcription d'IL-8. Il serait souhaitable que d'autres études soient réalisées afin d'identifier la ou les PKC présentes en aval du CysLT<sub>2</sub> et en amont de NF- $\kappa$ B.

Il est désormais évident que la signalisation d'un récepteur est un phénomène variable d'un type cellulaire à un autre. L'inhibition de la transcription d'IL-8 par le GF109203X chez les HUVEC (chapitre II), nous laisse malgré tout croire à une signalisation semblable entre les cellules 293LT2 et les cellules endothéliales en culture primaire. Cette hypothèse nécessite toutefois d'autres vérifications.

Les études sur la caractérisation du récepteur CysLT2 ont démontré une affinité de liaison égale entre le LTC<sub>4</sub> et le LTD<sub>4</sub> pour ce récepteur (Heise et al., 2000). Cependant nous avons observé que le LTC<sub>4</sub> est 10 fois plus puissant que le LTD<sub>4</sub> dans l'activation du récepteur CysLT2. De plus, cette différence était perceptible non seulement au niveau de la transactivation de l'IL-8, mais aussi au niveau des voies de signalisation AP-1 et NF-κB. Ces résultats surprennent d'autant plus que les études de liaison leur avait conféré des affinités similaires. Il est difficile, à ce sujet, de fournir une explication satisfaisante : la conformation différente entre les LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> pourrait effectivement permettre l'activation de protéines G différentielles. Globalement, leur conformation différente n'entraîne pas nécessairement une action sur les mêmes site de liaisons du récepteur. Il serait toutefois opportun de répéter les expériences d'affinité de liaison chez les cellules 293LT2 afin de s'assurer de l'égalité entre le LTC<sub>4</sub> et le LTD<sub>4</sub>. De la sorte, nous serions en mesure de vérifier si l'affinité est différente chez des cellules exprimant le récepteur de façon stable comparativement aux résultats préalablement obtenus par Sarau et al.

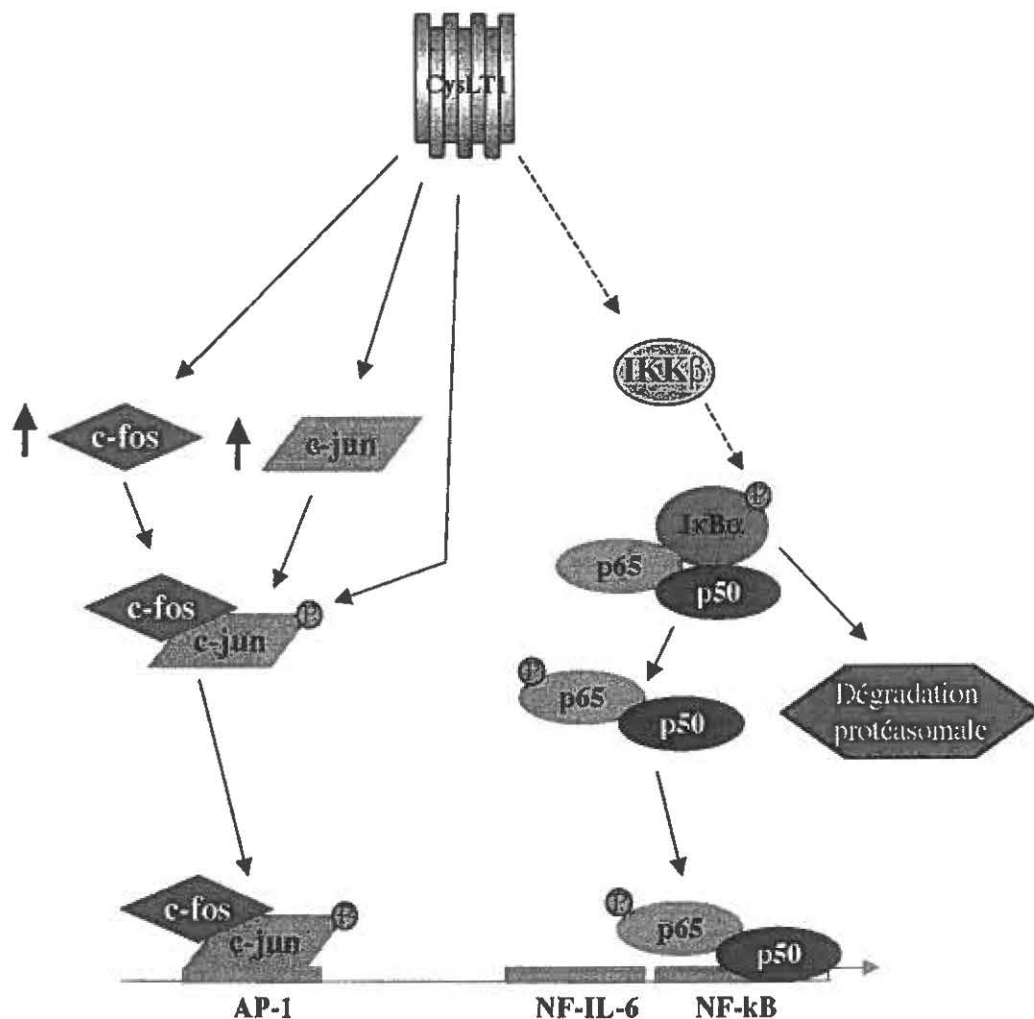
Dans le même ordre d'idées, des études d'incorporation de thymidine [H3] en réponse au LTC<sub>4</sub> et LTD<sub>4</sub> en présence d'indométhacine ont démontré aussi des effets supérieurs du LTC<sub>4</sub> (Heise et al., 2000). De plus, d'autres travaux rapportent une sécrétion d'IL-4 plus grande en réponse à une stimulation intracrine par le LTC<sub>4</sub> que par le LTD<sub>4</sub> chez les éosinophiles (Bandeira-Melo et al., 2002). Cette réponse au LTC<sub>4</sub> n'était pas inhibée par les antagonistes du CysLT1. Les auteurs suggèrent l'implication d'un autre récepteur CysLT, de localisation intracellulaire. Les études précédentes de liaison (LTC<sub>4</sub> = LTD<sub>4</sub>) les ont menés à rejeter l'implication du CysLT2 et permis de proposer l'hypothèse d'un troisième récepteur CysLT. Toutefois, à la lumière de nos

résultats, le récepteur intracellulaire de ces travaux serait probablement le récepteur CysLT2.

Lors de la rédaction de l'article présenté au chapitre II, Uzonyi et ses collaborateurs ont publié des résultats sur le CysLT2 et le PAR-1 (protease-activated receptor 1) (Uzonyi et al., 2006). Le PAR-1 est le récepteur de la thrombine, qui se trouve formé de façon concomitante avec le LTD<sub>4</sub> en situation inflammatoire. Ils démontrent qu'une fois le CysLT2 et le PAR-1 activés, ceux-ci induisent l'expression de gènes précoces chez les HUVEC. Soulignons que le patron d'expression génique semble être le même entre les deux agonistes. Parmi les gènes impliqués, on retrouve principalement l'EGR-1 (early growth response) et l'IL-8. Les auteurs démontrent également que le LTD<sub>4</sub> agit en synergie avec la thrombine dans l'induction de gènes. Ils ne rapportent cependant aucune signalisation impliquée dans le phénomène. Ils en suggèrent toutefois une qui implique la voie Ca<sup>2+</sup>-calmoduline-calcineurine-NFAT, à cause des effets de la cyclosporine sur l'expression génique induite par le LTD<sub>4</sub>. Nos résultats chez les HUVEC corroborent ces observations et vont même au-delà en mettant à jour certaines voies de signalisation en cause.

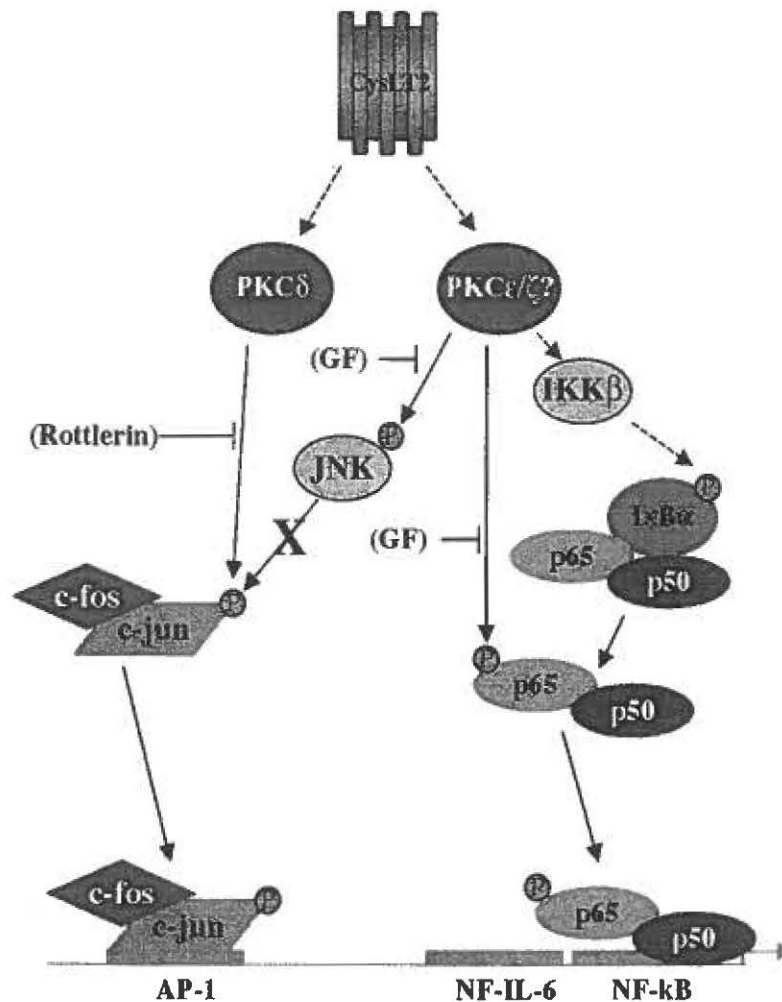
Du côté de la signalisation du récepteur CysLT2, nos travaux se concentrent principalement sur les éléments en aval, c'est-à-dire à proximité du promoteur cible. Toute la signalisation près du récepteur reste quant à elle à élucider. L'étude de la signalisation en amont constituerait l'une des perspectives du projet. Il serait intéressant d'identifier la ou les protéines G spécifiques en amont des voies AP-1 et NF-κB. L'utilisation de différents minigènes de protéines G serait appropriée à ces recherches. La vérification de l'efficacité des constructions contenant les minigènes est d'ailleurs en cours au laboratoire.

Les figures 4 et 5 sont des représentations schématiques qui résument la signalisation découverte pour les récepteurs CysLT1 et CysLT2 respectivement. Ces données présentées aux chapitres I et II s'avèrent somme toute très novatrices, car il s'agit du premier rapport de signalisation du récepteur CysLT2 et de l'implication de NF-κB et AP-1, ainsi que des PKC.



**Figure 4 : Schéma des mécanismes de signalisation du récepteur CysLT1 en réponse au LTD<sub>4</sub>, qui engendre la production de chimiokines.** Le récepteur CysLT1, qui est stimulé par les LTD<sub>4</sub>, induit l'expression des sous-unités AP-1 c-jun et c-fos et la formation d'un complexe c-Jun/c-Fos qui se lie à son site putatif pour induire la production de chimiokines. Le LTD<sub>4</sub> induit notamment la phosphorylation de IκBα et p65 et il active la formation du complexe NF-κB p50/p65, qui participe aussi dans la transcription de chimiokines. Les pointillés représentent des mécanismes hypothétiques.





**Figure 5 : Représentation schématique des mécanismes de signalisation du récepteur CysLT2 en réponse au LTC<sub>4</sub> menant à la production de chimiockine.** Le LTC<sub>4</sub> se lie au récepteur CysLT2, ce qui entraîne une activation des voies de signalisation AP-1 et NF-κB, impliquant les protéines kinases C. Le LTC<sub>4</sub> induit la phosphorylation de c-Jun et la formation d'un complexe AP-1 composé de c-Jun et c-Fos, qui se lie à son élément de réponse TRE (AP-1) pour induire la transcription de chimiockine. Le LTC<sub>4</sub> induit également la phosphorylation de IκBα et p65 et il active la formation du complexe NF-κB p50/p65, qui participe aussi dans la transcription de chimiockines. Les pointillés représentent des mécanismes hypothétiques et GF : GF109203X.

La découverte de ces nouvelles voies de signalisation induites par les récepteurs CysLT libère leur plein potentiel : elles nous permettent de cibler d'autres molécules qui possèdent aussi ces éléments de réponse dans leurs séquences promotrices (exemples :TNF- $\alpha$ , iNOS, RANTES MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , VEGF, c-Jun). La pertinence du TNF- $\alpha$  dans l'asthme sera discutée ultérieurement.

Tel qu'il est clairement établi, le CysLT1 et le CysLT2 répondent aux mêmes agonistes (Heise et al., 2000). Ainsi, il arrive parfois qu'un événement donné soit difficilement attribuable à un récepteur plutôt qu'à l'autre. Ce constat rend donc nécessaire la démystification des profils propres au CysLT1 et au CysLT2. À la lumière des résultats présentés aux chapitres I et II, nous savons maintenant que le CysLT1 et le CysLT2 induisent tous deux fortement la signalisation NF- $\kappa$ B et AP-1. Nous avons cependant observé que le CysLT1 privilégie la voie AP-1, alors que le CysLT2 privilégie la voie NF- $\kappa$ B. La similarité fonctionnelle des deux récepteurs est également confirmée par une augmentation de l'expression des mêmes chimiokines. Cette observation laisse présager une redondance des récepteurs CysLT. Malgré des effets semblables entre les deux récepteurs, la spécificité de chacun se situe sans doute au niveau de la localisation et de la concentration de chaque récepteur réparti selon les différents tissus. À ce titre, mentionnons que le récepteur CysLT2 est beaucoup plus présent dans le système cardiovasculaire et neuro-endocrine (Heise et al., 2000). Ajoutons aussi que les deux récepteurs sont exprimés chez la plupart des leucocytes, bien que chaque type cellulaire possède des concentrations différentes de chacun des deux récepteurs. Par exemple, dans les cellules hématopoïétiques, les mécanismes pourraient s'avérer très différents par rapport aux cellules de structure. Comme soulevé précédemment, la présence d'un récepteur pourrait également influencer l'autre. L'oligomérisation, ainsi que la proximité des récepteurs pourraient constituer, à cet égard, des facteurs importants. La contiguïté pourrait aussi permettre une communication croisée, c'est-à-dire une régulation entre les deux récepteurs, ce qui influencerait les événements de signalisation. En perspective, des études sur des cellules surexprimant les deux récepteurs seraient pertinentes.

Puisque les mécanismes de signalisation diffèrent d'un type cellulaire à un autre, nos études permettent de ressortir le potentiel des récepteurs CysLT1 et CysLT2 en condition de surexpression. Même si elles dévoilent des aspects qui étaient encore inconnus, ces découvertes doivent toutefois être confirmées dans des types cellulaires (de préférence en cultures primaires) exprimant les récepteurs de façon endogène. En effet, puisque les cystéinyl-leucotriènes sont des médiateurs inflammatoires (que l'on retrouve en conditions inflammatoires ou pathologiques), il est difficile d'étudier leurs effets chez des cellules de sujets normaux (en santé). L'expression des récepteurs ne semble pas suffisante dans les différentes lignées cellulaires, ni dans les cellules saines de culture primaire. Les expériences nécessitent sans doute un contexte inflammatoire favorable à l'étude de ces médiateurs lipidiques. En contexte inflammatoire, plusieurs facteurs sont présents simultanément ou de façon séquentielle, ce qui est probablement nécessaire au fonctionnement des cysLT. L'asthme, nous le savons, est multifactoriel et comporte une multitude de médiateurs qui interagissent entre eux. L'aspect problématique réside dans l'interprétation de résultats chez des cellules, isolées en boîte de Pétri, stimulées avec une seule molécule. Nous nous retrouvons dans un contexte non-inflammatoire, donc dans une situation sous optimale pour un médiateur inflammatoire. Cette difficulté ne nous est pas propre, car elle est également ressentie par les autres équipes qui travaillent dans le domaine des cysLT. Plusieurs effets *in vitro* répertoriés sur les cysLT nécessitent un prétraitement avec un autre stimulus (facteur de croissance, cytokine, etc) afin de percevoir des effets biologiques (Chibana et al., 2003; Espinosa et al., 2003; Mellor et al., 2001; Menard and Bissonnette, 2000; Panettieri et al., 1998).

#### *Modulation de la furine par les cysLT*

Le troisième chapitre est consacré au phénomène des changements de structure pulmonaire, un autre aspect important de la pathogénèse asthmatique. Le remodelage pulmonaire est principalement caractérisé par l'hyperplasie des muscles lisses, le dépôt de MEC et le remodelage vasculaire (Lazaar and Panettieri, 2005). Ces changements structuraux augmentent généralement avec la sévérité de la maladie. Le remodelage est donc plus présent dans les maladies pulmonaires telles que l'asthme sévère, le MPOC, le

SDRA, la fibrose idiopathique pulmonaire et la fibrose kystique (Chung, 2005; Lazaar and Panettieri, 2005).

Nous proposons, à partir des résultats présentés au chapitre III, un mécanisme par lequel les cysLT pourraient participer au remodelage pulmonaire. En fait, ce mécanisme consiste en l'augmentation de l'expression de la furine en réponse au LTD<sub>4</sub>, via le récepteur CysLT1. Quelques évidences dans la littérature suggèrent la participation des cysLT dans le remodelage pulmonaire; toutefois, ces mécanismes demeurent encore nébuleux. Ainsi, le blocage du récepteur CysLT1 inhibe le remodelage des voies aériennes induit par un allergène dans un modèle d'asthme chronique (Henderson et al., 2006). En effet, le montelukast réduit considérablement le dépôt de collagène chez ces souris. En outre, le LTD<sub>4</sub> augmente la production de collagène chez les myofibroblastes traités au TGFβ (Asakura et al., 2004). Notre équipe a suggéré la participation des cysLT dans la prolifération des muscles lisses bronchiques (Espinosa et al., 2003). Le LTD<sub>4</sub> augmente également le potentiel migratoire des fibroblastes en réponse à la fibronectine (Kato et al., 2005).

Souvenons-nous que la furine est une convertase de proprotéine, dont le rôle a été démontré dans le domaine du cancer, de la neuromodulation, de la maladie d'Alzheimer et de diverses infections virales (Thomas, 2002). L'étude de la furine en contexte inflammatoire représente un domaine de recherche plutôt négligé. En ce qui concerne sa participation dans l'asthme, aucun rapport n'a été publié à ce jour. Notons que la furine est généralement retrouvée à des concentrations très faible en condition normale. Nous nous sommes donc intéressé à l'expression de la furine en réponse à des médiateurs lipidiques retrouvés en conditions inflammatoires. De plus, nous avons constaté que plusieurs substrats de la furine étaient associés au remodelage pulmonaire. En effet, la furine est responsable de la maturation/activation de plusieurs molécules pro-fibrogéniques et pro-angiogéniques.

Nous avons initialement démontré que le LTD<sub>4</sub> pouvait induire l'expression de l'ARNm de la furine en fonction de la concentration et du temps. Parallèlement, une étude récente rapportait que le facteur activateur de plaquette (PAF), un autre lipide

inflammatoire, avait également la capacité d'augmenter l'expression de la furine chez des myofibroblastes de la cornée (Ottino et al., 2005). Le gène de la furine est sous le contrôle de trois promoteurs alternatifs, le P1, P1A et P1B (Ayoubi et al., 1994). Selon la pauvre littérature sur la régulation du gène *fur*, le promoteur P1, contrairement aux deux autres, serait de nature inductible. En effet, il est transactivable par les facteurs de transcription HIF, C/EBP, Smad et GATA (Ayoubi et al., 1994; Blanchette et al., 2001a; Laprise et al., 2002; McMahon et al., 2005). Des résultats obtenus à partir d'essais luciférase nous confirment une régulation transcriptionnelle de la furine par le LTD<sub>4</sub>. Cette régulation du gène *fur* se retrouve sous le contrôle exclusif du promoteur P1. Comme nous l'avons envisagé, les promoteurs P1A et P1B ne sont guère influencés par les cysLT.

Les études découlant des mutants de délétion en 5' du promoteur P1 démontrent une réduction graduelle de la transactivation en fonction de la longueur du promoteur. Ces résultats suggèrent la participation de plusieurs sites putatifs, tout au long du promoteur P1, dans la régulation de l'expression de la furine par le LTD<sub>4</sub>. À cet effet, l'analyse de séquences du promoteurs P1 du gène *fur* révèle des quantités impressionnantes de sites potentiels de liaison à des facteurs de transcription. Étant donné que la plus grande proportion de l'activité transcriptionnelle provenait de la portion proximale (P1-*KpnI*), nous nous sommes par conséquent concentrés sur cette région de promoteur.

Nous savions, de prime abord, qu'un site potentiel de liaison pour AP-1 était situé en position -179 de la séquence P1-*KpnI*. Étant déjà au fait des évidences de l'activation de cette voie de signalisation par le récepteur CysLT1 (chapitre I), nous nous sommes d'abord attardé sur ce site. Les résultats obtenus au chapitre III démontrent que le LTD<sub>4</sub> induit fortement la liaison à l'élément de réponse AP-1 de P1-*KpnI*. Nous avons également identifié la nature du complexe AP-1 qui se liait au promoteur P1, qui était composé de c-Jun et c-Fos. Ces résultats nous ont mené à la construction d'un mutant du site putatif AP-1 situé dans la portion proximale du promoteur P1. À la lumière de nos résultats, la participation de AP-1 dans la transactivation du gène *fur* s'est avérée

significative, mais partielle. Cela laisse présager l'implication d'au moins un autre élément de réponse. Notons tout de même qu'il s'agit de la première démonstration de la régulation du gène *fur* par le facteur de transcription AP-1. Cette découverte suggère que d'autres stimuli activateurs de AP-1 pourraient également induire l'expression du gène *fur*.

Ensuite, nous nous sommes dirigés vers les facteurs de transcription GATA. Comme démontré précédemment par l'équipe du Dre Claire Dubois, deux sites GATA sont retrouvés en position -66 et +62 de la région P1-Kpn1 (Laprise et al., 2002). Ces motifs sont importants pour l'expression de la furine chez les cellules mégakaryoblastiques (Laprise et al., 2002).

En ce qui a trait à l'asthme et l'allergie, l'élément de prédilection de la famille GATA reste sans aucun doute GATA3 (Ray and Cohn, 1999). Celui-ci semble jouer un rôle important dans l'établissement de la pathologie. Il se trouve d'abord fortement induit et il est responsable de la différenciation des lymphocytes T vers le phénotype Th2 (Farrar et al., 2002). L'expression de GATA-3 est cependant limitée aux cellules T. Pour ce qui est de GATA-1, il est responsable de la maturation terminale des érythrocytes et des mégakaryocytes (Shimizu and Yamamoto, 2005). GATA-2, pour sa part, régule la prolifération et la régénérescence des progéniteurs hématopoïétiques (Shimizu and Yamamoto, 2005). GATA-4 et -6, quant à eux, ont des fonctions bien établies dans le système cardiovasculaire (Molkentin). Quelques informations pertinentes quant à GATA-6 dans le poumon ont été répertoriées. Ainsi, GATA-6 participe à la régulation transcriptionnelle dans l'épithélium respiratoire. Il régule l'expression de la protéine A du surfactant (Bruno et al., 2000) et du promoteur de TTF-1 (thyroid transcription factor-1) (Shaw-White et al., 1999). Finalement, l'observation suivante tend à confirmer l'importance de GATA6 en tant que facteur déterminant du poumon : des cellules précurseurs embryonnaires déficientes en GATA-6 ne peuvent contribuer à l'épithélium pulmonaire chez des souris embryonnaires chimériques (Morrissey et al., 1998).

Nos résultats d'études de liaison de protéines nucléaires à l'ADN démontrent une forte liaison sur l'élément de réponse GATA de P1-Kpn1 *fur* à la suite d'une stimulation avec le LTD<sub>4</sub>. Le complexe GATA formé est composé de GATA-4 et GATA-6. Il s'agit ici de la première démonstration de la formation d'un complexe GATA en réponse aux cysLT. Une association entre GATA-4 et -6 avait toutefois été démontrée chez des myocytes cardiaques (Charron et al., 1999). Souvenons-nous, cependant, que les cellules de structure expriment les GATA-4, -5 et -6, alors que les cellules hématopoïétiques génèrent plutôt les GATA-1, -2 et -3. Chez les leucocytes, on pourrait donc s'attendre à l'implication d'un ou d'autres éléments de la famille de GATA, parmi GATA-1, -2 ou -3. En effet, les différents GATA peuvent lier la même séquence sur l'ADN (Molkentin, 2000). La variation ou la spécificité se trouve plutôt au niveau de la disponibilité des protéines GATA.

Pour leur part, les résultats obtenus à l'aide des mutants GATA se sont avérés plutôt décevants. En effet, la mutation des sites de liaison de GATA n'influence aucunement la transactivation du promoteur P1-Kpn1 (résultats non présentés). Nous avons procédé à différentes stratégies de mutation, mais sans succès. Notons que les analyses de séquençage confirment néanmoins la présence des mutations. En fait, les mutations GATA conduisaient même à de faibles augmentations de la transactivation du gène *fur*. De plus, la transactivation de la construction luciférase contenant la mutation double GATA-AP1 se retrouve moins inhibée que la mutation AP-1 simple. GATA pourrait donc être un élément de régulation négatif, permettant de circonscrire ou de contrôler la réponse. Ceci pourrait-il aussi expliquer la faible expression de la furine? Une explication possible réside également dans le fait que la séquence mutée, lorsqu'utilisée dans les études liaisons, permet toujours une liaison à l'ADN à la suite d'une stimulation avec le LTD<sub>4</sub>. Cependant, des résultats obtenus à l'aide de séquences GATA consensus démontraient également une augmentation de liaison induite par le LTD<sub>4</sub> ; cette augmentation était toutefois absente à l'aide de la séquence consensus mutée. La situation semble particulière à la séquence furine, mais l'état actuel des connaissances ne permet pas une meilleure compréhension du phénomène.

La pertinence patho-physiologique de l'augmentation d'expression de la furine réside dans l'induction de la maturation/activation de ses substrats. À cet effet, la modulation de la furine par le LTD<sub>4</sub> coïncide avec l'augmentation de la maturation de la MT1-MMP et de l'activation d'un membre de la famille du TGFβ. Ces résultats démontrent nettement l'impact physiologique de la furine en réponse au cysLT. De plus, la spécificité de maturation de la MT1-MMP est confirmée par son inhibition complète par l'α1-PDX, un inhibiteur spécifique de la furine. En conséquence, la MT1-MMP régule la dégradation de la MEC (collagène I, II et III) et lorsqu'elle se retrouve en présence de TIMP-2, elle active la gélatinase MMP2 (Butler et al., 1998). La MMP-2 activée a la capacité de libérer des facteurs de croissance tels que le EGF; ce dernier permet la prolifération des muscles lisses des voies aériennes (Holgate et al., 2003). Le MMP2 participe également à l'activation du TGFβ, par la libération de son prosegment (Karsdal et al., 2002) et elle digère la collagénase de type I, IV et V, ainsi que la gélatine, la fibronectine et la laminine (Aimes and Quigley, 1995; Patterson et al., 2001).

L'activation du gène rapporteur répondant aux SMAD par le LTD<sub>4</sub> est quant à elle partiellement inhibée par l'α1-PDX. Ces résultats nous suggèrent une activation par le TGFβ1 ; cependant, il est vrai que d'autres molécules, telles que les BMP et les activines, puissent aussi être responsables de cette activation. Des expériences effectuées à l'aide d'anticorps bloquant du TGFβ1 pourraient confirmer si les effets observés sont effectivement causés par le TGFβ1. D'ailleurs, des résultats obtenus au laboratoire démontrent que le LTD<sub>4</sub> induit la production de TGFβ1 chez les cellules 293LT1 (Bossé et al., article soumis). Le TGFβ1 constitue un facteur déterminant dans le remodelage et la fibrose pulmonaire (Bartram and Speer, 2004; Duvernelle et al., 2003). L'augmentation de l'expression du TGFβ dans l'asthme est sans équivoque (Redington et al., 1997). Bref, le fait d'augmenter, même de façon marginale, son activation est susceptible d'influencer l'homéostasie pulmonaire.



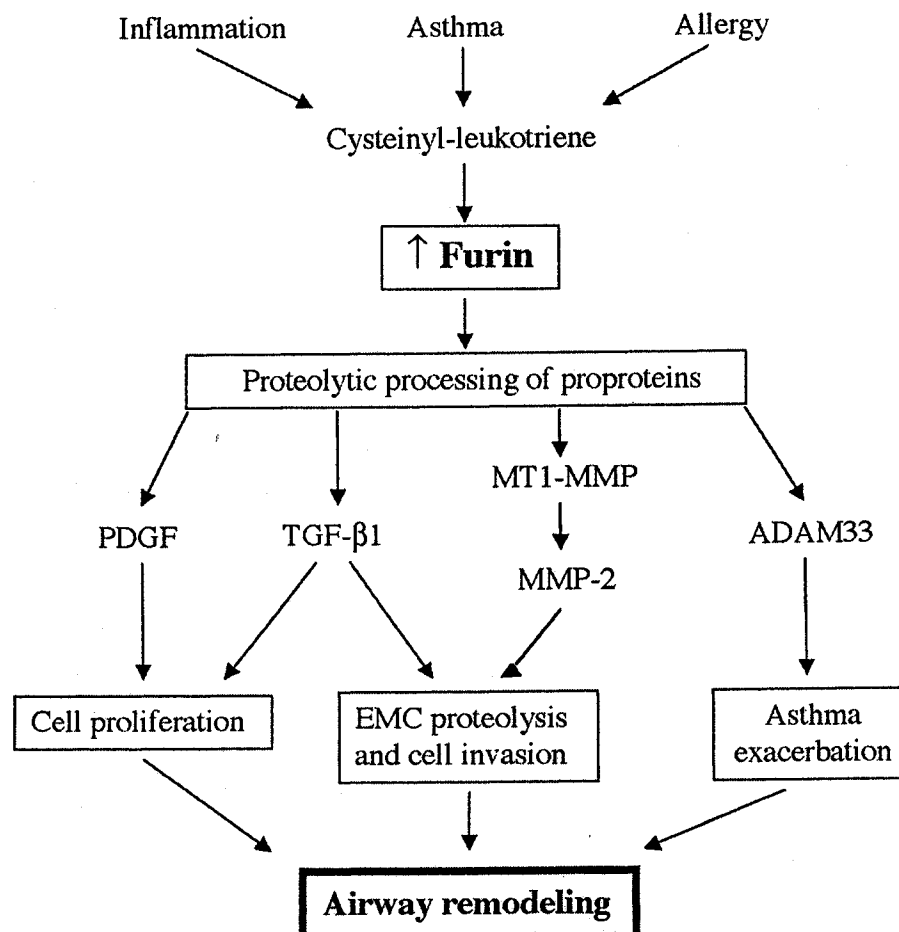
Ajoutons de surcroît que ADAM33 (a disintegrin and metalloprotease 33), un membre de la famille ADAM, a été identifié, par analyse génétique, comme un gène de susceptibilité à l'asthme (Van Eerdewegh et al., 2002). L'activation de ADAM33 nécessite un clivage enzymatique au niveau d'un site de reconnaissance furine (Garlisi et al., 2003). De plus, ADAM33 a également été associé au remodelage pulmonaire (Holgate et al., 2004). Son expression est principalement située dans les muscles lisses (Haïtchi et al., 2005), une localisation similaire au récepteur CysLT1 (Lynch et al., 1999). Dans la suite du projet, des études sont prévues pour cerner l'association entre le CysLT1, la furine et ADAM33.

Une fois l'augmentation de la furine démontrée, ainsi que l'impact de cette induction sur la maturation/activation de substrats, il est intéressant d'analyser les substrats associés au remodelage pulmonaire. Nous présentons au tableau 1 une liste non exhaustive des autres substrats de la furine potentiellement impliqués dans les processus du remodelage pulmonaire (Figure 6).

**Tableau 1 : Liste des Substrats de la furine potentiellement impliqués dans le processus de remodelage pulmonaire**

<b>Substrats</b>	<b>Références</b>
<b>Facteurs de croissance</b>	
Pro-TGF- $\beta$	Dubois <i>et al.</i> , 1995
Pro-IGF-I	Duguay <i>et al.</i> , 1995
Pro-IGF-II	Seidah <i>et al.</i> , 1999
Pro-PDGF-A	Siegfried <i>et al.</i> , 2005
Pro-PDGF-B	Siegfried <i>et al.</i> , 2005
<b>Protéines de la matrice extracellulaire</b>	
Pro-MT1-MMP	Yana <i>et al.</i> , 2000
Pro-ADAM-17 (TACE)	Black <i>et al.</i> , 1997
Pro-ADAM-33	Garlisi <i>et al.</i> , 2003
<b>Récepteurs</b>	
Pro-récepteur à IGF-I	Stawowy <i>et al.</i> , 2004
E-cadhérine	Posthaus <i>et al.</i> , 1998
<b>Protéines virales</b>	
Respiratory-syncitial virus F	Bolt <i>et al.</i> , 2000
HA de l'influenza aviaire	Stieneke-Grober <i>et al.</i> , 1992
Exotoxine A de pseudomonas	Moehring <i>et al.</i> , 1993
Infectious bronchitis virus E2	Cavanagh <i>et al.</i> , 1986
<b>Protéine sérique</b>	
Pro-endothéline	Denault <i>et al.</i> , 1995

Adapté de Nakayama *et al.*, 1997



**Figure 6 : Impacts potentiels de l'augmentation de l'expression de la furine par les cysLT sur le remodelage pulmonaire.** Nous proposons dans ce schéma une série d'événements séquentiels dans un contexte de remodelage pulmonaire. À partir de l'inflammation, il y a production de leucotriènes, qui conduisent à l'augmentation de la furine, résultant en une activation/maturation de facteurs pro-fibrogéniques/angiogéniques impliqués dans le remodelage pulmonaire.

Dans les prochaines lignes, nous nous attarderons à soulever la pertinence de l'activation de quelques substrats de la furine dans les poumons. En premier lieu, le Pro-ADAM-17 ou TACE (TNF $\alpha$ -converting enzyme) est l'enzyme responsable de l'activation du TNF- $\alpha$ , qui est d'abord sous la forme d'un précurseur associé à la membrane cellulaire (Moss et al., 1997). ADAM-17 contient un propeptide qui est lié à son domaine catalytique par un site consensus furine, qui doit être clivé au niveau de ce site pour être activé (Black et al., 1997). Le TNF $\alpha$  est une cible thérapeutique importante lors d'inflammation chronique impliquant des neutrophiles (Holgate et al., 2006). D'ailleurs, une attention particulière a récemment été portée à la participation du TNF $\alpha$  dans l'asthme. Une étude rapporte effectivement des concentrations élevées de TNF $\alpha$  dans les lavages bronchoalvéolaires de patients atteints d'asthme sévère (Howarth et al., 2005). Il n'y a toutefois pas de différence entre les sujets asthmatiques modérés et les sujets témoins (en santé). Le TNF $\alpha$  semble donc être impliqué dans les cas plus sévères d'asthme. De plus, les monocytes périphériques de patients souffrants d'asthme sévère ont une expression à la hausse de TNF $\alpha$  associé à la membrane, de TACE et des sous-unités p55 et p75 des récepteurs du TNF (Berry et al., 2006). Les traitements anti-TNF $\alpha$  procurent des effets positifs sur les symptômes asthmatiques, les fonctions pulmonaires et l'hyper-réactivité bronchique (Howarth et al., 2005). À ce sujet, des études cliniques avec des patients atteints d'asthme sévère utilisant des anti-TNF $\alpha$  sont présentement en cours. Finalement, souvenons-nous que le CysLT1 et CysLT2 induisent les facteurs de transcription NF- $\kappa$ B et AP-1, des éléments de réponse présents dans le promoteur du TNF $\alpha$  qui sont importants pour la régulation de son expression. À ce propos, une étude, chez les mastocytes humains préalablement traités avec l'IL-4, a démontré une augmentation de l'expression du TNF $\alpha$  en réponse au LTD $_4$  (Mellor et al., 2002). Les cysLT pourraient ainsi agir sur la régulation de l'expression et de l'activation du TNF $\alpha$ , consolidant son implication dans les cas d'asthme sévère.

Les PDGF sont quant à eux impliqués dans la prolifération des muscles lisses bronchiques, alors que le VEGF-c et l'endothéline participent à la croissance des muscles lisses vasculaires (Hamid and Minshall, 2000). Les IGF participent également à la régulation de la prolifération des cellules musculaires lisses des voies aériennes (Noveral

et al., 1994). Une étude rapporte aussi que la prolifération de ces cellules induite par le LTD<sub>4</sub> serait causée par la modulation de l'axe IGF (Cohen et al., 1995). La synergie entre le IGF-1 et le LTD<sub>4</sub> menant à la prolifération cellulaire implique la participation de la MMP1. En effet, la MMP-1, qui est une protéase de la protéine de liaison d'IGF, est sécrétée par les cellules musculaires lisses en réponse au LTD<sub>4</sub> (Rajah et al., 1999). Ajoutons également que des quantités élevées de MMP-1 ont été rapportées dans ces cellules chez les asthmatiques (Rajah et al., 1999). Étant donné que la furine a la capacité de maturer le IGF-1 et le IGF-2, une augmentation de son expression par le LTD<sub>4</sub> pourrait favoriser l'activation des molécules de la famille IGF.

Des résultats préliminaires de notre laboratoire nous indiquent également une modulation à la hausse de la furine par le récepteur CysLT2. La participation de ce récepteur dans la fibrose induite par la bléomycine a été mise en évidence chez les souris déficientes en CysLT2 (Beller et al., 2004). Nous pourrions donc émettre l'hypothèse d'une participation du CysLT2 dans le remodelage pulmonaire via la modulation de la furine. Soulignons également que la localisation du récepteur CysLT2 au niveau de l'endothélium est une position stratégique pour sa participation dans les processus d'angiogénèse.

La pharmacopée servant au contrôle des cas plus sévères de maladies pulmonaires est encore aujourd'hui déficiente. Souvenons-nous que les corticostéroïdes, qui sont les médicaments les plus utilisés pour le traitement de l'asthme, ne constituent pas un remède efficace contre l'inflammation neutrophilique et le remodelage pulmonaire (Busse et al., 2000; Holgate et al., 2006; Leung and Bloom, 2003). En effet, les glucocorticoïdes ne contrôlent que partiellement les conditions asthmatiques sévères. Notons également que la réponse bronchique aux leucotriènes est résistante aux glucocorticoïdes (Gyllfors et al., 2006). À ce propos et à partir des observations soulevées dans cette thèse, nous supposons que les antagonistes des CysLT pourraient représenter une alternative ou une combinaison appropriée pour contrôler l'inflammation pulmonaire dans les cas plus sévères d'asthme, de MPOC et de fibroses kystiques (toutes impliquent les neutrophiles

et du remodelage pulmonaire).

Fréquemment, lorsque le diagnostic de la pathologie est émis, les changements structuraux sont déjà bien présents. Puisque le remodelage pulmonaire n'est pas réversible, il faut donc miser sur un diagnostic rapide de la maladie, afin d'éviter les dommages irréversibles. À la lumière de nos observations, nous pourrions émettre une question à ce sujet: étant donné la facilité d'administration et la sécurité associées aux antagonistes des leucotriènes, ceux-ci pourraient-ils servir de traitement préventif ?

### *Perspectives*

Les résultats que nous avons présentés dans cette thèse ne font qu'ouvrir la voie à une multitude de projets. Une juxtaposition entre nos résultats préliminaires et la littérature nous permet d'émettre plusieurs hypothèses intéressantes, qui vont au-delà de la pathogénèse de l'asthme et de l'allergie.

Comme nous l'avons mentionné précédemment, l'angiogénèse constitue l'une des parties importantes du remodelage pulmonaire. D'ailleurs, il a été démontré que l'inflammation asthmatique stimule la croissance de nouveaux vaisseaux sanguins, qui vont contribuer à l'obstruction des voies aériennes et à l'hyper-réactivité bronchique (Charan et al., 1997; Hoshino et al., 2001a). À ce sujet, des résultats préliminaires obtenus au laboratoire tendent à corroborer l'idée que les leucotriènes soient impliqués dans le processus de remodelage pulmonaire. Nous avons effectivement observé que les cellules 293LT1 et 293LT2 induisent la production de VEGF en réponse aux cysLT. Qui plus est, il a aussi été rapporté que les antagonistes du CysLT1 régulaient la perméabilité vasculaire en réduisant l'expression du VEGF dans un modèle d'asthme allergique (Lee et al., 2004b). Cependant, l'augmentation du VEGF par les cysLT n'a pas été répertoriée jusqu'à maintenant. Diverses équipes de recherche ont également démontré l'augmentation de l'expression du VEGF dans l'asthme (Asai et al., 2003; Hoshino et al.,

2001b; Kanazawa et al., 2002). Finalement, une publication récente démontre que le VEGF induit le remodelage et l'inflammation pulmonaire (Lee et al., 2004a).

D'un autre côté, l'angiogénèse constitue également une partie importante de la progression tumorale. Elle est nécessaire à la croissance de la tumeur, afin de la nourrir et de l'oxygéner. À cet effet, quelques parallèles entre la cancérogénèse et les cysLT ont déjà été soulevés. Par exemple, les travaux de l'équipe du Dr A. Sjolander proposent une association entre les cysLT et le cancer. Ils ont observé que les cysLT inhibaient l'apoptose (Wikstrom et al., 2003) et augmentaient la  $\beta$ -caténine et le bcl-2 (facteur anti-apoptotique) (Mezhybovska et al., 2006). Ils ont également démontré que le récepteur CysLT1 contribuait à la prolifération de cellules intestinales tumorales (Parhamifar et al., 2005). La 5-LO se retrouve également exprimé dans plusieurs tissus et cellules cancéreuses (Romano and Claria, 2003). La recherche pour établir les liens entre les cysLT et le cancer n'en est toutefois qu'à ses débuts.

Parmi les facteurs importants de l'angiogénèse on retrouve le VEGF, le PDGF, l'IL-8, le bFGF et le TGF- $\beta$ 1 (Beckner, 1999; Costa et al., 2004; Streit and Detmar, 2003). Comme nous l'avons observé, les cysLT entraînent une augmentation de l'expression du VEGF. De plus, les chapitres I et II démontrent clairement que les cysLT sont d'excellents inducteurs de la production d'IL-8. Nous savons que le VEGF et l'IL-8 représentent des facteurs clés dans le processus de néovascularisation (Wilson and Hii, 2006). Ces facteurs, additionnés à l'augmentation de l'expression de la furine, laissent présager une implication des cysLT dans le phénomène de progression tumorale. Nous avons, de plus, démontré que le LTD<sub>4</sub>, par l'intermédiaire de la furine, pouvait induire la maturation de la MT1-MMP. Celle-ci est l'un des substrats de la furine qui est associé à la progression tumorale.

Au sortir de toutes ces considérations, nous suggérons l'hypothèse suivante : l'inhibition des CysLT entraînerait une inhibition de la production d'IL-8, de VEGF; en plus elle inhiberait l'expression à la hausse de la furine, ce qui conduit vraisemblablement

à un impact important sur la patho-physiologie humaine, comme le remodelage pulmonaire, l'inflammation et probablement la progression tumorale.

Il est déjà bien connu que l'infection virale est un élément déclencheur important des exacerbations dans l'asthme (Folkerts et al., 1998; Gern and Busse, 1999; Johnston et al., 1995). L'expression des cysLT est d'ailleurs augmentée lors d'exacerbations induites par les virus chez les asthmatiques (Piedimonte et al., 2005; van Schaik et al., 1999; Volovitz et al., 1988). Les mécanismes générés par les cysLT en contexte d'infection virale demeurent cependant inconnus. Chez les patients souffrant d'asthme atopique, les infections au rhinovirus créent des symptômes du tractus respiratoire distal plus fréquent et de plus longue durée (Corne et al., 2002). L'inflammation présente lors des exacerbations aiguës (Fahy et al., 1995; Turner et al., 1995) et des infections virales sont de prédominance neutrophilique (Wark et al., 2002). Le lien établi précédemment, entre l'effet des antagonistes classiques sur le recrutement des neutrophiles et la production d'IL-8 par les cysLT, pourrait également s'appliquer dans les cas d'infections virales. L'action des cysLT pourrait d'autant plus être amplifiée par l'IFN $\gamma$  : cette cytokine est produite lors d'infections virales (Hessel et al., 1997) et elle augmente l'expression des récepteurs CysLT1 et CysLT2 sur les muscles lisses bronchiques (Amrani et al., 2001). D'autre part, la furine est reconnue pour jouer un rôle dans les infections virales et bactériennes. Le RSV (respiratory syncytial virus) (Bolt et al., 2000) et l'influenza (Thomas, 2002) sont des substrats connus de la furine. Une autre perspective innovatrice serait d'étudier l'association entre les cysLT et l'augmentation de la réplication virale.



## CONCLUSION

Les travaux présentés dans cette thèse avaient pour but de découvrir les mécanismes d'action générés par les cysLT, qui contribuent à la pathogénèse de l'asthme sévère. Nos résultats nous ont d'abord permis de proposer une implication des cysLT dans l'inflammation neutrophilique : un effet paracrine des cysLT sur les neutrophiles, via la production d'IL-8, qui constitue un puissant facteur chimiotactique pour ces cellules. Nous avons de surcroît approfondi les connaissances liées à la signalisation; plus spécifiquement, nous avons étudié la signalisation qui conduit à la régulation transcriptionnelle des chimiokines par l'intermédiaire des récepteurs CysLT1 et CysLT2 en réponse au cysLT. Ainsi, nous avons démontré que les cysLT engendraient une forte activation des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B, soulevant par le fait même le potentiel de ces médiateurs lipidiques dans la modulation de plusieurs facteurs inflammatoires. Nos travaux ont également contribué à l'établissement d'un nouveau mécanisme par lequel les cysLT pourraient participer au remodelage pulmonaire. Nos résultats révèlent en effet une modulation de la furine par les cysLT, en plus d'approfondir la compréhension de sa régulation, ainsi que ses conséquences sur la maturation de substrats impliqués dans le remodelage pulmonaire.

En définitive, toutes les données que nous avons présentées permettent d'apprécier la complexité de la maladie asthmatique. Cependant, au sortir de ce processus de recherche, nous avons pu constater que la compréhension des mécanismes propres aux récepteurs CysLT demeure encore très parcellaire. Les conclusions de cette thèse permettent de mieux comprendre l'impact des cysLT dans la pathogénèse pulmonaire et suggèrent en plus leur participation dans les cas plus sévères d'asthme, de MPOC et de fibrose kystique. L'attention particulière portée au CysLT2 a également permis de dévoiler pour une première fois le potentiel inflammatoire de ce récepteur. Nos observations ont de plus confirmé l'importance de développer des antagonistes spécifiques pour ce récepteur. Pour terminer, nous soutenons que la voie des antagonistes devrait être davantage considérée, puisque sa portée demeure encore sous-estimée. Et que dire d'un double antagoniste CysLT1/CysLT2.

## REMERCIEMENTS

Les recherches et la rédaction de cette thèse ont été grandement facilitées par le soutien financier de l'Institut de Recherche en Santé du Canada.

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs de recherche Marek Rola-Pleszczynski et Jana Stankova qui m'ont accueilli dans leur équipe pendant toutes ces années. Grâce à leur ouverture d'esprit et à leur support, j'ai pu développer mes capacités en travail de laboratoire et approfondir mes connaissances scientifiques. J'ai beaucoup apprécié votre disponibilité et je conserverai un bon souvenir des discussions agréables que j'ai eues avec vous. En votre présence, je me suis toujours senti respecté et ce malgré votre notoriété : cette attitude fait preuve, à mon avis, de l'humanisme qui vous distingue.

Ma reconnaissance va également aux membres du jury pour avoir pris le temps de lire et de fournir des critiques constructives à mon travail. Merci à Dr Paul Naccache, Dre Nathalie Rivard et Dr André Cantin.

Je désire également exprimer ma gratitude à mes collègues de laboratoire qui se sont investis dans mes recherches. Avec vous, j'ai développé le goût d'établir des collaborations qui ont eu autant de succès scientifiques qu'humains. Je remercie Ynuk Bossé, Caroline Poisson, Steeve Véronneau, Sylvie Turcotte, Maryse Thivierge, Christian LeGouil et Patrick Giguère.

Dans tout ce processus, je tiens à souligner l'apport particulièrement important de deux personnes. Tout d'abord, un grand merci à Alexandre Cloutier pour sa disponibilité et sa compétence scientifique. Sans son implication, cette thèse serait encore loin d'être terminée. Merci beaucoup, aussi, pour ton support constant, ton agréable compagnie et ton amitié. Ensuite, je souhaite remercier Stéphanie McMahon pour sa grande contribution dans un des projets. Grâce à sa présence, mes recherches ont pris une orientation inattendue et innovatrice. Je te remercie pour toutes ces discussions, pour ta bonne humeur et pour ton amitié.

Je tiens à remercier spécialement ma famille qui, malgré la distance, me supporte constamment dans mes décisions et projets. Merci Mi, Phil, Anthony et Bob.

Finalement, je remercie Caroline pour sa compréhension, son support, son investissement dans ce processus exigeant et bien plus encore...

## **BIBLIOGRAPHIE :**

- Adler, V.S. Polotskaya, A. Wagner, F. and Kraft A.K. 1992. Affinity-purified c- Jun Amino-terminal Protein Kinase Requires Serine/Threonine Phosphorylation for Activity. *J Biol Chem.* 267: 17001-05.
- Aihara, M., D. Tsuchimoto, H. Takizawa, A. Azuma, H. Wakebe, Y. Ohmoto, K. Imagawa, M. Kikuchi, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1997. Mechanisms involved in Helicobacter pylori-induced interleukin-8 production by a gastric cancer cell line, MKN45. *Infect Immun.* 65:3218-24.
- Aimes, R.T., and J.P. Quigley. 1995. Matrix metalloproteinase-2 is an interstitial collagenase. Inhibitor-free enzyme catalyzes the cleavage of collagen fibrils and soluble native type I collagen generating the specific 3/4- and 1/4-length fragments. *J Biol Chem.* 270:5872-6.
- Allen, S.P., A.P. Sampson, P.J. Piper, A.H. Chester, S.K. Ohri, and M.H. Yacoub. 1993. Enhanced excretion of urinary leukotriene E4 in coronary artery disease and after coronary artery bypass surgery. *Coron Artery Dis.* 4:899-904.
- Amrani, Y., P.E. Moore, R. Hoffman, S.A. Shore, and R.A. Panettieri, Jr. 2001. Interferon-gamma modulates cysteinyl leukotriene receptor-1 expression and function in human airway myocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 164:2098-101.
- Anderson, M.E., R.D. Allison, and A. Meister. 1982. Interconversion of leukotrienes catalyzed by purified gamma-glutamyl transpeptidase: concomitant formation of leukotriene D4 and gamma-glutamyl amino acids. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 79:1088-91.
- Angel, P., and M. Karin. 1991. The role of Jun, Fos and the AP-1 complex in cell-proliferation and transformation. *Biochim Biophys Acta.* 1072:129-57.
- Anrather, J., V. Csizmadia, M.P. Soares, and H. Winkler. 1999. Regulation of NF-kappaB RelA phosphorylation and transcriptional activity by p21(ras) and protein kinase C $\zeta$  in primary endothelial cells. *J Biol Chem.* 274:13594-603.
- Antonicelli, L., C. Bucca, M. Neri, F. De Benedetto, P. Sabbatani, F. Bonifazi, H.G. Eichler, Q. Zhang, and D.D. Yin. 2004. Asthma severity and medical resource utilisation. *Eur Respir J.* 23:723-9.
- Arias, E., and B.L. Smith. 2003. Deaths: preliminary data for 2001. *Natl Vital Stat Rep.* 51:1-44.
- Asai, K., H. Kanazawa, H. Kamoi, S. Shiraishi, K. Hirata, and J. Yoshikawa. 2003. Increased levels of vascular endothelial growth factor in induced sputum in asthmatic patients. *Clin Exp Allergy.* 33:595-9.
- Asakura, T., Y. Ishii, K. Chibana, and T. Fukuda. 2004. Leukotriene D4 stimulates collagen production from myofibroblasts transformed by TGF-beta. *J Allergy Clin Immunol.* 114:310-5.
- Ashburner, B.P., S.D. Westerheide, and A.S. Baldwin, Jr. 2001. The p65 (RelA) subunit of NF-kappaB interacts with the histone deacetylase (HDAC) corepressors HDAC1 and HDAC2 to negatively regulate gene expression. *Mol Cell Biol.* 21:7065-77.
- Assoian, R.K., A. Komoriya, C.A. Meyers, D.M. Miller, and M.B. Sporn. 1983. Transforming growth factor-beta in human platelets. Identification of a major storage site, purification, and characterization. *J Biol Chem.* 258:7155-60.

- Ayoubi, T.A., J.W. Creemers, A.J. Roebroek, and W.J. Van de Ven. 1994. Expression of the dibasic proprotein processing enzyme furin is directed by multiple promoters. *J Biol Chem.* 269:9298-303.
- Baeuerle, P.A., and D. Baltimore. 1989. A 65-kappaD subunit of active NF-kappaB is required for inhibition of NF-kappaB by I kappaB. *Genes Dev.* 3:1689-98.
- Baggiolini, M., and I. Clark-Lewis. 1992. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett.* 307:97-101.
- Bandeira-Melo, C., L.J. Woods, M. Phoofolo, and P.F. Weller. 2002. Intracrine cysteinyl leukotriene receptor-mediated signaling of eosinophil vesicular transport-mediated interleukin-4 secretion. *J Exp Med.* 196:841-50.
- Bannister, A.J., T. Oehler, D. Wilhelm, P. Angel, and T. Kouzarides. 1995. Stimulation of c-Jun activity by CBP: c-Jun residues Ser63/73 are required for CBP induced stimulation in vivo and CBP binding in vitro. *Oncogene.* 11:2509-14.
- Barnes, P.J. 2003. New concepts in chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Med.* 54:113-29.
- Barnes, P.J., and A.J. Woolcock. 1998. Difficult asthma. *Eur Respir J.* 12:1209-18.
- Bartram, U., and C.P. Speer. 2004. The role of transforming growth factor beta in lung development and disease. *Chest.* 125:754-65.
- Batra, V., A.I. Musani, A.T. Hastie, S. Khurana, K.A. Carpenter, J.G. Zangrilli, and S.P. Peters. 2004. Bronchoalveolar lavage fluid concentrations of transforming growth factor (TGF)-beta1, TGF-beta2, interleukin (IL)-4 and IL-13 after segmental allergen challenge and their effects on alpha-smooth muscle actin and collagen III synthesis by primary human lung fibroblasts. *Clin Exp Allergy.* 34:437-44.
- Bayes-Genis, A., C.A. Conover, and R.S. Schwartz. 2000. The insulin-like growth factor axis: A review of atherosclerosis and restenosis. *Circ Res.* 86:125-30.
- Beckner, M.E. 1999. Factors promoting tumor angiogenesis. *Cancer Invest.* 17:594-623.
- Becler, K., L. Hakansson, and S. Rak. 2002. Treatment of asthmatic patients with a cysteinyl leukotriene receptor-1 antagonist montelukast (Singulair), decreases the eosinophil survival-enhancing activity produced by peripheral blood mononuclear leukocytes in vitro. *Allergy.* 57:1021-8.
- Beeh, K.M., O. Kornmann, R. Buhl, S.V. Culpitt, M.A. Giembycz, and P.J. Barnes. 2003. Neutrophil chemotactic activity of sputum from patients with COPD: role of interleukin 8 and leukotriene B4. *Chest.* 123:1240-7.
- Bell, R.L., P.R. Young, D. Albert, C. Lanni, J.B. Summers, D.W. Brooks, P. Rubin, and G.W. Carter. 1992. The discovery and development of zileuton: an orally active 5-lipoxygenase inhibitor. *Int J Immunopharmacol.* 14:505-10.
- Beller, T.C., A. Maekawa, D.S. Friend, K.F. Austen, and Y. Kanaoka. 2004. Targeted gene disruption reveals the role of the cysteinyl leukotriene 2 receptor in increased vascular permeability and in bleomycin-induced pulmonary fibrosis in mice. *J Biol Chem.* 279:46129-34.
- Berry, M.A., B. Hargadon, M. Shelley, D. Parker, D.E. Shaw, R.H. Green, P. Bradding, C.E. Brightling, A.J. Wardlaw, and I.D. Pavord. 2006. Evidence of a role of tumor necrosis factor alpha in refractory asthma. *N Engl J Med.* 354:697-708.
- Bisgaard, H., and S. Groth. 1987. Bronchial effects of leukotriene D4 inhalation in normal human lung. *Clin Sci (Lond).* 72:585-92.

- Black, R.A., C.T. Rauch, C.J. Kozlosky, J.J. Peschon, J.L. Slack, M.F. Wolfson, B.J. Castner, K.L. Stocking, P. Reddy, S. Srinivasan, N. Nelson, N. Boiani, K.A. Schooley, M. Gerhart, R. Davis, J.N. Fitzner, R.S. Johnson, R.J. Paxton, C.J. March, and D.P. Cerretti. 1997. A metalloproteinase disintegrin that releases tumour-necrosis factor-alpha from cells. *Nature*. 385:729-33.
- Blanchette, F., N. Rivard, P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano, and C.M. Dubois. 2001a. Cross-talk between the p42/p44 MAP kinase and Smad pathways in transforming growth factor beta 1-induced furin gene transactivation. *J Biol Chem*. 276:33986-94.
- Blanchette, F., P. Rudd, F. Grondin, L. Attisano, and C.M. Dubois. 2001b. Involvement of Smads in TGFbeta1-induced furin (fur) transcription. *J Cell Physiol*. 188:264-73.
- Bolt, G., L.O. Pedersen, and H.H. Birkeslund. 2000. Cleavage of the respiratory syncytial virus fusion protein is required for its surface expression: role of furin. *Virus Res*. 68:25-33.
- Bosse, Y., C. Thompson, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. Fibroblast growth factor 2 and transforming growth factor beta1 synergism in human bronchial smooth muscle cell proliferation. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34:746-53.
- Brach, M.A., S. de Vos, C. Arnold, H.J. Gruss, R. Mertelsmann, and F. Herrmann. 1992. Leukotriene B4 transcriptionally activates interleukin-6 expression involving NK-chi B and NF-IL6. *Eur J Immunol*. 22:2705-11.
- Brasier, A.R., M. Jamaluddin, A. Casola, W. Duan, Q. Shen, and R.P. Garofalo. 1998. A promoter recruitment mechanism for tumor necrosis factor-alpha-induced interleukin-8 transcription in type II pulmonary epithelial cells. Dependence on nuclear abundance of Rel A, NF-kappaB1, and c-Rel transcription factors. *J Biol Chem*. 273:3551-61.
- Brocklehurst, W.E. 1960. The release of histamine and formation of a slow-reacting substance (SRS-A) during anaphylactic shock. *J Physiol*. 151:416-35.
- Bruno, M.D., T.R. Korfhagen, C. Liu, E.E. Morrissey, and J.A. Whitsett. 2000. GATA-6 activates transcription of surfactant protein A. *J Biol Chem*. 275:1043-9.
- Busse, W.W., S. Banks-Schlegel, and S.E. Wenzel. 2000. Pathophysiology of severe asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 106:1033-42.
- Butler, G.S., M.J. Butler, S.J. Atkinson, H. Will, T. Tamura, S. Schade van Westrum, T. Crabbe, J. Clements, M.P. d'Ortho, and G. Murphy. 1998. The TIMP2 membrane type 1 metalloproteinase "receptor" regulates the concentration and efficient activation of progelatinase A. A kinetic study. *J Biol Chem*. 273:871-80.
- Cameron, A., J. Appel, R.A. Houghten, and I. Lindberg. 2000. Polyarginines are potent furin inhibitors. *J Biol Chem*. 275:36741-9.
- Capra, V. 2004. Molecular and functional aspects of human cysteinyl leukotriene receptors. *Pharmacol Res*. 50:1-11.
- Capra, V., M.R. Accomazzo, S. Ravasi, M. Parenti, M. Macchia, S. Nicosia, and G.E. Rovati. 2003. Involvement of prenylated proteins in calcium signaling induced by LTD4 in differentiated U937 cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat*. 71:235-51.

- Capra, V., M.D. Thompson, A. Sala, D.E. Cole, G. Folco, and G.E. Rovati. 2006. Cysteinyl-leukotrienes and their receptors in asthma and other inflammatory diseases: Critical update and emerging trends. *Med Res Rev.*
- Caramori, G., K. Ito, M. Contoli, A. Di Stefano, S.L. Johnston, I.M. Adcock, and A. Papi. 2006. Molecular mechanisms of respiratory virus-induced asthma and COPD exacerbations and pneumonia. *Curr Med Chem.* 13:2267-90.
- Carey, M. 1998. The enhanceosome and transcriptional synergy. *Cell.* 92:5-8.
- Carry, M., V. Korley, J.T. Willerson, L. Weigelt, A.W. Ford-Hutchinson, and P. Tagari. 1992. Increased urinary leukotriene excretion in patients with cardiac ischemia. In vivo evidence for 5-lipoxygenase activation. *Circulation.* 85:230-6.
- Chakravarty, N., and B. Uvnas. 1960. Histamine and a lipid-soluble smooth-muscle stimulating principle ('SRS') in anaphylactic reaction. *Acta Physiol Scand.* 48:302-14.
- Charan, N.B., E.M. Baile, and P.D. Pare. 1997. Bronchial vascular congestion and angiogenesis. *Eur Respir J.* 10:1173-80.
- Charo, I.F., and M.B. Taubman. 2004. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. *Circ Res.* 95:858-66.
- Charron, F., P. Paradis, O. Bronchain, G. Nemer, and M. Nemer. 1999. Cooperative interaction between GATA-4 and GATA-6 regulates myocardial gene expression. *Mol Cell Biol.* 19:4355-65.
- Chen, L.Y., A. Doerner, P.F. Lehmann, S. Huang, G. Zhong, and Z.K. Pan. 2005. A novel protein kinase C (PKCepsilon) is required for fMet-Leu-Phe-induced activation of NF-kappaB in human peripheral blood monocytes. *J Biol Chem.* 280:22497-501.
- Chibana, K., Y. Ishii, T. Asakura, and T. Fukuda. 2003. Up-Regulation of Cysteinyl Leukotriene 1 Receptor by IL-13 Enables Human Lung Fibroblasts to Respond to Leukotriene C(4) and Produce Eotaxin. *J Immunol.* 170:4290-5.
- Christodoulouopoulos, P., D.Y. Leung, M.W. Elliott, J.C. Hogg, S. Muro, M. Toda, S. Laberge, and Q.A. Hamid. 2000. Increased number of glucocorticoid receptor-beta-expressing cells in the airways in fatal asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 106:479-84.
- Chu, L.S., E.Q. Wei, G.L. Yu, S.H. Fang, Y. Zhou, M.L. Wang, and W.P. Zhang. 2006. Pranlukast reduces neutrophil but not macrophage/microglial accumulation in brain after focal cerebral ischemia in mice. *Acta Pharmacol Sin.* 27:282-8.
- Chung, K.F. 2005. The role of airway smooth muscle in the pathogenesis of airway wall remodeling in chronic obstructive pulmonary disease. *Proc Am Thorac Soc.* 2:347-54; discussion 371-2.
- Ciceri, P., M. Rabuffetti, A. Monopoli, and S. Nicosia. 2001. Production of leukotrienes in a model of focal cerebral ischaemia in the rat. *Br J Pharmacol.* 133:1323-9.
- Claret, F.X., M. Hibi, S. Dhut, T. Toda, and M. Karin. 1996. A new group of conserved coactivators that increase the specificity of AP-1 transcription factors. *Nature.* 383:453-7.
- Cohen, P., J.P. Noveral, A. Bhala, S.E. Nunn, D.J. Herrick, and M.M. Grunstein. 1995. Leukotriene D4 facilitates airway smooth muscle cell proliferation via modulation of the IGF axis. *Am J Physiol.* 269:L151-7.

- Cohn, L., J.S. Tepper, and K. Bottomly. 1998. IL-4-independent induction of airway hyperresponsiveness by Th2, but not Th1, cells. *J Immunol.* 161:3813-6.
- Cokugras, H., N. Akcakaya, Seckin, Y. Camcioglu, N. Sarimurat, and F. Aksoy. 2001. Ultrastructural examination of bronchial biopsy specimens from children with moderate asthma. *Thorax.* 56:25-9.
- Coleman, R.A., R.M. Eglen, R.L. Jones, S. Narumiya, T. Shimizu, W.L. Smith, S.E. Dahlen, J.M. Drazen, P.J. Gardiner, W.T. Jackson, and et al. 1995. Prostanoid and leukotriene receptors: a progress report from the IUPHAR working parties on classification and nomenclature. *Adv Prostaglandin Thromboxane Leukot Res.* 23:283-5.
- Cookson, W. 1999. The alliance of genes and environment in asthma and allergy. *Nature.* 402:B5-11.
- Cookson, W.O. 2002. Asthma genetics. *Chest.* 121:7S-13S.
- Corne, J.M., C. Marshall, S. Smith, J. Schreiber, G. Sanderson, S.T. Holgate, and S.L. Johnston. 2002. Frequency, severity, and duration of rhinovirus infections in asthmatic and non-asthmatic individuals: a longitudinal cohort study. *Lancet.* 359:831-4.
- Costa, C., R. Soares, and F. Schmitt. 2004. Angiogenesis: now and then. *Apmis.* 112:402-12.
- Cummings, R., Y. Zhao, D. Jacoby, E.W. Spannhake, M. Ohba, J.G. Garcia, T. Watkins, D. He, B. Saatian, and V. Natarajan. 2004. Protein kinase Cdelta mediates lysophosphatidic acid-induced NF-kappaB activation and interleukin-8 secretion in human bronchial epithelial cells. *J Biol Chem.* 279:41085-94.
- d'Ortho, M.P., H. Will, S. Atkinson, G. Butler, A. Messent, J. Gavrilovic, B. Smith, R. Timpl, L. Zardi, and G. Murphy. 1997. Membrane-type matrix metalloproteinases 1 and 2 exhibit broad-spectrum proteolytic capacities comparable to many matrix metalloproteinases. *Eur J Biochem.* 250:751-7.
- Dahlen, S.E., J. Bjork, P. Hedqvist, K.E. Arfors, S. Hammarstrom, J.A. Lindgren, and B. Samuelsson. 1981. Leukotrienes promote plasma leakage and leukocyte adhesion in postcapillary venules: in vivo effects with relevance to the acute inflammatory response. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78:3887-91.
- Datta, Y.H., M. Romano, B.C. Jacobson, D.E. Golan, C.N. Serhan, and B.M. Ewenstein. 1995. Peptido-leukotrienes are potent agonists of von Willebrand factor secretion and P-selectin surface expression in human umbilical vein endothelial cells. *Circulation.* 92:3304-11.
- de Blic, J., I. Tillie-Leblond, A.B. Tonnel, F. Jaubert, P. Scheinmann, and P. Gosset. 2004. Difficult asthma in children: an analysis of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 113:94-100.
- Delafontaine, P., Y.H. Song, and Y. Li. 2004. Expression, regulation, and function of IGF-1, IGF-1R, and IGF-1 binding proteins in blood vessels. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 24:435-44.
- Derynck, R., and Y.E. Zhang. 2003. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF-beta family signalling. *Nature.* 425:577-84.
- Desmet, C., P. Gosset, E. Henry, V. Garze, P. Faisca, N. Vos, F. Jaspar, D. Melotte, B. Lambrecht, D. Desmecht, B. Pajak, M. Moser, P. Lekeux, and F. Bureau. 2005.

- Treatment of experimental asthma by decoy-mediated local inhibition of activator protein-1. *Am J Respir Crit Care Med.* 172:671-8.
- Devillier, P., N. Baccard, and C. Advenier. 1999. Leukotrienes, leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma: an update. Part II: clinical studies with leukotriene receptor antagonists and leukotriene synthesis inhibitors in asthma. *Pharmacol Res.* 40:15-29.
- Diaz-Meco, M.T., E. Berra, M.M. Municio, L. Sanz, J. Lozano, I. Dominguez, V. Diaz-Golpe, M.T. Lain de Lera, J. Alcami, C.V. Paya, and et al. 1993. A dominant negative protein kinase C zeta subspecies blocks NF-kappa B activation. *Mol Cell Biol.* 13:4770-5.
- Drazen, J.M. 1998. Leukotrienes as mediators of airway obstruction. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:S193-200.
- Duan, C., J.R. Bauchat, and T. Hsieh. 2000. Phosphatidylinositol 3-kinase is required for insulin-like growth factor-I-induced vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Circ Res.* 86:15-23.
- Duran, A., M.T. Diaz-Meco, and J. Moscat. 2003. Essential role of RelA Ser311 phosphorylation by zetaPKC in NF-kappaB transcriptional activation. *Embo J.* 22:3910-8.
- Duvernelle, C., V. Freund, and N. Frossard. 2003. Transforming growth factor-beta and its role in asthma. *Pulm Pharmacol Ther.* 16:181-96.
- Eferl, R., and E.F. Wagner. 2003. AP-1: a double-edged sword in tumorigenesis. *Nat Rev Cancer.* 3:859-68.
- Elias, J.A., C.G. Lee, T. Zheng, B. Ma, R.J. Homer, and Z. Zhu. 2003a. New insights into the pathogenesis of asthma. *J Clin Invest.* 111:291-7.
- Elias, J.A., C.G. Lee, T. Zheng, Y. Shim, and Z. Zhu. 2003b. Interleukin-13 and leukotrienes: an intersection of pathogenetic schema. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 28:401-4.
- Elkington, P.T., and J.S. Friedland. 2006. Matrix metalloproteinases in destructive pulmonary pathology. *Thorax.* 61:259-66.
- Elshaw, S.R., N. Henderson, A.J. Knox, S.A. Watson, D.J. Buttle, and S.R. Johnson. 2004. Matrix metalloproteinase expression and activity in human airway smooth muscle cells. *Br J Pharmacol.* 142:1318-24.
- Espinosa, K., Y. Bosse, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2003. CysLT1 receptor upregulation by TGF-beta and IL-13 is associated with bronchial smooth muscle cell proliferation in response to LTD4. *J Allergy Clin Immunol.* 111:1032-40.
- Fahy, J.V., K.W. Kim, J. Liu, and H.A. Boushey. 1995. Prominent neutrophilic inflammation in sputum from subjects with asthma exacerbation. *J Allergy Clin Immunol.* 95:843-52.
- Fang, S.H., E.Q. Wei, Y. Zhou, M.L. Wang, W.P. Zhang, G.L. Yu, L.S. Chu, and Z. Chen. 2006. Increased expression of cysteinyl leukotriene receptor-1 in the brain mediates neuronal damage and astrogliosis after focal cerebral ischemia in rats. *Neuroscience.* 140:969-79.
- Farfel, Z., H.R. Bourne, and T. Iiri. 1999. The expanding spectrum of G protein diseases. *N Engl J Med.* 340:1012-20.
- Farrar, J.D., H. Asnagli, and K.M. Murphy. 2002. T helper subset development: roles of instruction, selection, and transcription. *J Clin Invest.* 109:431-5.



- Feinmark, S.J., and P.J. Cannon. 1986. Endothelial cell leukotriene C4 synthesis results from intercellular transfer of leukotriene A4 synthesized by polymorphonuclear leukocytes. *J Biol Chem.* 261:16466-72.
- Ferrara, N. 2004. Vascular endothelial growth factor: basic science and clinical progress. *Endocr Rev.* 25:581-611.
- Figueroa, D.J., L. Borish, D. Baramki, G. Philip, C.P. Austin, and J.F. Evans. 2003. Expression of cysteinyl leukotriene synthetic and signalling proteins in inflammatory cells in active seasonal allergic rhinitis. *Clin Exp Allergy.* 33:1380-8.
- Figueroa, D.J., R.M. Breyer, S.K. Defoe, S. Kargman, B.L. Daugherty, K. Waldburger, Q. Liu, M. Clements, Z. Zeng, G.P. O'Neill, T.R. Jones, K.R. Lynch, C.P. Austin, and J.F. Evans. 2001. Expression of the cysteinyl leukotriene 1 receptor in normal human lung and peripheral blood leukocytes. *Am J Respir Crit Care Med.* 163:226-33.
- Fine, A., and R.H. Goldstein. 1987. The effect of transforming growth factor-beta on cell proliferation and collagen formation by lung fibroblasts. *J Biol Chem.* 262:3897-902.
- Fletcher, C., and R. Peto. 1977. The natural history of chronic airflow obstruction. *Br Med J.* 1:1645-8.
- Foda, H.D., S. George, E. Rollo, M. Drews, C. Conner, J. Cao, R.A. Panettieri, Jr., and S. Zucker. 1999. Regulation of gelatinases in human airway smooth muscle cells: mechanism of progelatinase A activation. *Am J Physiol.* 277:L174-82.
- Folco, G., G. Rossoni, C. Buccellati, F. Berti, J. Maclof, and A. Sala. 2000. Leukotrienes in cardiovascular diseases. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:S112-6.
- Folkerts, G., W.W. Busse, F.P. Nijkamp, R. Sorkness, and J.E. Gern. 1998. Virus-induced airway hyperresponsiveness and asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 157:1708-20.
- Forse, R.A. 2000. Biology of heterotrimeric G-protein signaling. *Crit Care Med.* 28:N53-9.
- Gagliardo, R., P. Chanez, M. Mathieu, A. Bruno, G. Costanzo, C. Gougat, I. Vachier, J. Bousquet, G. Bonsignore, and A.M. Vignola. 2003. Persistent activation of nuclear factor-kappaB signaling pathway in severe uncontrolled asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 168:1190-8.
- Garcia, J.G., T.C. Noonan, W. Jubiz, and A.B. Malik. 1987. Leukotrienes and the pulmonary microcirculation. *Am Rev Respir Dis.* 136:161-9.
- Garcia-Zepeda, E.A., M.E. Rothenberg, R.T. Ownbey, J. Celestin, P. Leder, and A.D. Luster. 1996. Human eotaxin is a specific chemoattractant for eosinophil cells and provides a new mechanism to explain tissue eosinophilia. *Nat Med.* 2:449-56.
- Garlisi, C.G., J. Zou, K.E. Devito, F. Tian, F.X. Zhu, J. Liu, H. Shah, Y. Wan, M. Motasim Billah, R.W. Egan, and S.P. Umland. 2003. Human ADAM33: protein maturation and localization. *Biochem Biophys Res Commun.* 301:35-43.
- Gern, J.E., and W.W. Busse. 1999. Association of rhinovirus infections with asthma. *Clin Microbiol Rev.* 12:9-18.
- Gibson, P.G., J.L. Simpson, and N. Saltos. 2001. Heterogeneity of airway inflammation in persistent asthma : evidence of neutrophilic inflammation and increased sputum interleukin-8. *Chest.* 119:1329-36.

- Gilman, A.G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem.* 56:615-49.
- Gonzalo, J.A., C.M. Lloyd, D. Wen, J.P. Albar, T.N. Wells, A. Proudfoot, A.C. Martinez, M. Dorf, T. Bjerke, A.J. Coyle, and J.C. Gutierrez-Ramos. 1998. The coordinated action of CC chemokines in the lung orchestrates allergic inflammation and airway hyperresponsiveness. *J Exp Med.* 188:157-67.
- Green, S.A., M.P. Malice, W. Tanaka, C.A. Tozzi, and T.F. Reiss. 2004. Increase in urinary leukotriene LTE4 levels in acute asthma: correlation with airflow limitation. *Thorax.* 59:100-4.
- Gu, L., Y. Okada, S.K. Clinton, C. Gerard, G.K. Sukhova, P. Libby, and B.J. Rollins. 1998. Absence of monocyte chemoattractant protein-1 reduces atherosclerosis in low density lipoprotein receptor-deficient mice. *Mol Cell.* 2:275-81.
- Gyllfors, P., S.E. Dahlen, M. Kumlin, K. Larsson, and B. Dahlen. 2006. Bronchial responsiveness to leukotriene D4 is resistant to inhaled fluticasone propionate. *J Allergy Clin Immunol.* 118:78-83.
- Haitchi, H.M., R.M. Powell, T.J. Shaw, P.H. Howarth, S.J. Wilson, D.I. Wilson, S.T. Holgate, and D.E. Davies. 2005. ADAM33 expression in asthmatic airways and human embryonic lungs. *Am J Respir Crit Care Med.* 171:958-65.
- Hamelmann, E., and E.W. Gelfand. 1999. Role of IL-5 in the development of allergen-induced airway hyperresponsiveness. *Int Arch Allergy Immunol.* 120:8-16.
- Hamid, Q., M.K. Tulic, M.C. Liu, and R. Moqbel. 2003. Inflammatory cells in asthma: mechanisms and implications for therapy. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S5-S12; discussion S12-7.
- Hamid, Q.A., and E.M. Minshall. 2000. Molecular pathology of allergic disease: I: lower airway disease. *J Allergy Clin Immunol.* 105:20-36.
- Harada, A., N. Sekido, T. Akahoshi, T. Wada, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1994. Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation. *J Leukoc Biol.* 56:559-64.
- Harant, H., R. de Martin, P.J. Andrew, E. Foglar, C. Dittrich, and I.J. Lindley. 1996. Synergistic activation of interleukin-8 gene transcription by all-trans-retinoic acid and tumor necrosis factor-alpha involves the transcription factor NF-kappaB. *J Biol Chem.* 271:26954-61.
- Hart, L.A., V.L. Krishnan, I.M. Adcock, P.J. Barnes, and K.F. Chung. 1998. Activation and localization of transcription factor, nuclear factor-kappaB, in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 158:1585-92.
- Hatsuzawa, K., K. Murakami, and K. Nakayama. 1992. Molecular and enzymatic properties of furin, a Kex2-like endoprotease involved in precursor cleavage at Arg-X-Lys/Arg-Arg sites. *J Biochem (Tokyo).* 111:296-301.
- Hayashi, K., M. Takahashi, K. Kimura, W. Nishida, H. Saga, and K. Sobue. 1999. Changes in the balance of phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (Akt) and the mitogen-activated protein kinases (ERK/p38MAPK) determine a phenotype of visceral and vascular smooth muscle cells. *J Cell Biol.* 145:727-40.
- Hayden, M.S., and S. Ghosh. 2004. Signaling to NF-kappaB. *Genes Dev.* 18:2195-224.
- Heise, C.E., B.F. O'Dowd, D.J. Figueroa, N. Sawyer, T. Nguyen, D.S. Im, R. Stocco, J.N. Bellefeuille, M. Abramovitz, R. Cheng, D.L. Williams, Jr., Z. Zeng, Q. Liu, L. Ma, M.K. Clements, N. Coulombe, Y. Liu, C.P. Austin, S.R. George, G.P.

- O'Neill, K.M. Metters, K.R. Lynch, and J.F. Evans. 2000. Characterization of the human cysteinyl leukotriene 2 receptor. *J Biol Chem.* 275:30531-6.
- Henderson, W.R., Jr., G.K. Chiang, Y.T. Tien, and E.Y. Chi. 2006. Reversal of allergen-induced airway remodeling by CysLT1 receptor blockade. *Am J Respir Crit Care Med.* 173:718-28.
- Henderson, W.R., Jr., L.O. Tang, S.J. Chu, S.M. Tsao, G.K. Chiang, F. Jones, M. Jonas, C. Pae, H. Wang, and E.Y. Chi. 2002. A role for cysteinyl leukotrienes in airway remodeling in a mouse asthma model. *Am J Respir Crit Care Med.* 165:108-16.
- Hershey, G.K. 2003. IL-13 receptors and signaling pathways: An evolving web. *J Allergy Clin Immunol.* 111:677-90.
- Hess, J., P. Angel, and M. Schorpp-Kistner. 2004. AP-1 subunits: quarrel and harmony among siblings. *J Cell Sci.* 117:5965-73.
- Hessel, E.M., A.J. Van Oosterhout, I. Van Ark, B. Van Esch, G. Hofman, H. Van Loveren, H.F. Savelkoul, and F.P. Nijkamp. 1997. Development of airway hyperresponsiveness is dependent on interferon-gamma and independent of eosinophil infiltration. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 16:325-34.
- Hibi, M., A. Lin, T. Smeal, A. Minden, and M. Karin. 1993. Identification of an oncoprotein- and UV-responsive protein kinase that binds and potentiates the c-Jun activation domain. *Genes Dev.* 7:2135-48.
- Hobbie, S., L.M. Chen, R.J. Davis, and J.E. Galan. 1997. Involvement of mitogen-activated protein kinase pathways in the nuclear responses and cytokine production induced by *Salmonella typhimurium* in cultured intestinal epithelial cells. *J Immunol.* 159:5550-9.
- Hoffmann, E., O. Dittrich-Breiholz, H. Holtmann, and M. Kracht. 2002. Multiple control of interleukin-8 gene expression. *J Leukoc Biol.* 72:847-55.
- Hogan, S.P., K.I. Matthaei, J.M. Young, A. Koskinen, I.G. Young, and P.S. Foster. 1998. A novel T cell-regulated mechanism modulating allergen-induced airways hyperreactivity in BALB/c mice independently of IL-4 and IL-5. *J Immunol.* 161:1501-9.
- Holgate, S.T., K.S. Bodey, A. Janezic, A.J. Frew, A.P. Kaplan, and L.M. Teran. 1997. Release of RANTES, MIP-1 alpha, and MCP-1 into asthmatic airways following endobronchial allergen challenge. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:1377-83.
- Holgate, S.T., D.E. Davies, S. Rorke, J. Cakebread, G. Murphy, R.M. Powell, and J.W. Holloway. 2004. ADAM 33 and its association with airway remodeling and hyperresponsiveness in asthma. *Clin Rev Allergy Immunol.* 27:23-34.
- Holgate, S.T., J. Holloway, S. Wilson, P.H. Howarth, H.M. Haitchi, S. Babu, and D.E. Davies. 2006. Understanding the pathophysiology of severe asthma to generate new therapeutic opportunities. *J Allergy Clin Immunol.* 117:496-506; quiz 507.
- Holgate, S.T., M. Peters-Golden, R.A. Panettieri, and W.R. Henderson, Jr. 2003. Roles of cysteinyl leukotrienes in airway inflammation, smooth muscle function, and remodeling. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S18-34; discussion S34-6.
- Hosaka, M., M. Nagahama, W.S. Kim, T. Watanabe, K. Hatsuzawa, J. Ikemizu, K. Murakami, and K. Nakayama. 1991. Arg-X-Lys/Arg-Arg motif as a signal for precursor cleavage catalyzed by furin within the constitutive secretory pathway. *J Biol Chem.* 266:12127-30.

- Hoshino, M., T. Izumi, and T. Shimizu. 1998. Leukotriene D4 activates mitogen-activated protein kinase through a protein kinase Calpha-Raf-1-dependent pathway in human monocytic leukemia THP-1 cells. *J Biol Chem.* 273:4878-82.
- Hoshino, M., Y. Nakamura, and Q.A. Hamid. 2001a. Gene expression of vascular endothelial growth factor and its receptors and angiogenesis in bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 107:1034-8.
- Hoshino, M., M. Takahashi, and N. Aoike. 2001b. Expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and angiogenin immunoreactivity in asthmatic airways and its relationship to angiogenesis. *J Allergy Clin Immunol.* 107:295-301.
- Howarth, P.H., K.S. Babu, H.S. Arshad, L. Lau, M. Buckley, W. McConnell, P. Beckett, M. Al Ali, A. Chauhan, S.J. Wilson, A. Reynolds, D.E. Davies, and S.T. Holgate. 2005. Tumour necrosis factor (TNFalpha) as a novel therapeutic target in symptomatic corticosteroid dependent asthma. *Thorax.* 60:1012-8.
- Howarth, P.H., A.J. Knox, Y. Amrani, O. Tliba, R.A. Panettieri, Jr., and M. Johnson. 2004. Synthetic responses in airway smooth muscle. *J Allergy Clin Immunol.* 114:S32-50.
- Ichiyama, T., S. Hasegawa, M. Umeda, K. Terai, T. Matsubara, and S. Furukawa. 2003. Pranlukast inhibits NF-kappa B activation in human monocytes/macrophages and T cells. *Clin Exp Allergy.* 33:802-7.
- Ignatz, R.A., and J. Massague. 1986. Transforming growth factor-beta stimulates the expression of fibronectin and collagen and their incorporation into the extracellular matrix. *J Biol Chem.* 261:4337-45.
- Ishinaga, H., K. Takeuchi, C. Kishioka, S. Suzuki, C. Basbaum, and Y. Majima. 2005. Pranlukast inhibits NF-kappaB activation and MUC2 gene expression in cultured human epithelial cells. *Pharmacology.* 73:89-96.
- Israel, E., A.R. Fischer, M.A. Rosenberg, C.M. Lilly, J.C. Callery, J. Shapiro, J. Cohn, P. Rubin, and J.M. Drazen. 1993. The pivotal role of 5-lipoxygenase products in the reaction of aspirin-sensitive asthmatics to aspirin. *Am Rev Respir Dis.* 148:1447-51.
- Janknecht, R., and T. Hunter. 1996. Transcription. A growing coactivator network. *Nature.* 383:22-3.
- Jean, F., K. Stella, L. Thomas, G. Liu, Y. Xiang, A.J. Reason, and G. Thomas. 1998. alpha1-Antitrypsin Portland, a bioengineered serpin highly selective for furin: application as an antipathogenic agent. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:7293-8.
- Johnson, E.N., and K.M. Druey. 2002. Heterotrimeric G protein signaling: role in asthma and allergic inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 109:592-602.
- Johnston, S.L., P.K. Pattemore, G. Sanderson, S. Smith, F. Lampe, L. Josephs, P. Symington, S. O'Toole, S.H. Myint, D.A. Tyrrell, and et al. 1995. Community study of role of viral infections in exacerbations of asthma in 9-11 year old children. *Bmj.* 310:1225-9.
- Jones, T.R., M. Labelle, M. Belley, E. Champion, L. Charette, J. Evans, A.W. Ford-Hutchinson, J.Y. Gauthier, A. Lord, P. Masson, and et al. 1995. Pharmacology of montelukast sodium (Singulair), a potent and selective leukotriene D4 receptor antagonist. *Can J Physiol Pharmacol.* 73:191-201.

- Kaminska, B., B. Pyrzynska, I. Ciechomska, and M. Wisniewska. 2000. Modulation of the composition of AP-1 complex and its impact on transcriptional activity. *Acta Neurobiol Exp (Wars)*. 60:395-402.
- Kanazawa, H., K. Hirata, and J. Yoshikawa. 2002. Involvement of vascular endothelial growth factor in exercise induced bronchoconstriction in asthmatic patients. *Thorax*. 57:885-8.
- Karin, M. 1995. The regulation of AP-1 activity by mitogen-activated protein kinases. *J Biol Chem*. 270:16483-6.
- Karin, M., Z. Liu, and E. Zandi. 1997. AP-1 function and regulation. *Curr Opin Cell Biol*. 9:240-6.
- Karsdal, M.A., L. Larsen, M.T. Engsig, H. Lou, M. Ferreras, A. Lochter, J.M. Delaisse, and N.T. Foged. 2002. Matrix metalloproteinase-dependent activation of latent transforming growth factor-beta controls the conversion of osteoblasts into osteocytes by blocking osteoblast apoptosis. *J Biol Chem*. 277:44061-7.
- Kato, J., T. Kohyama, H. Okazaki, M. Desaki, T. Nagase, S.I. Rennard, and H. Takizawa. 2005. Leukotriene D4 potentiates fibronectin-induced migration of human lung fibroblasts. *Clin Immunol*. 117:177-81.
- Keam, S.J., K.A. Lyseng-Williamson, and K.L. Goa. 2003. Pranlukast: a review of its use in the management of asthma. *Drugs*. 63:991-1019.
- Kikuchi, I., S. Kikuchi, T. Kobayashi, K. Hagiwara, Y. Sakamoto, M. Kanazawa, and M. Nagata. 2006. Eosinophil trans-basement membrane migration induced by interleukin-8 and neutrophils. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 34:760-5.
- Kim, D.C., F.I. Hsu, N.A. Barrett, D.S. Friend, R. Grenningloh, I.C. Ho, A. Al-Garawi, J.M. Lora, B.K. Lam, K.F. Austen, and Y. Kanaoka. 2006. Cysteinyl leukotrienes regulate Th2 cell-dependent pulmonary inflammation. *J Immunol*. 176:4440-8.
- Kips, J.C., K.G. Tournoy, and R.A. Pauwels. 2000. Gene knockout models of asthma. *Am J Respir Crit Care Med*. 162:S66-70.
- Knorr, B., L.M. Franchi, H. Bisgaard, J.H. Vermeulen, P. LeSouef, N. Santanello, T.M. Michele, T.F. Reiss, H.H. Nguyen, and D.L. Bratton. 2001. Montelukast, a leukotriene receptor antagonist, for the treatment of persistent asthma in children aged 2 to 5 years. *Pediatrics*. 108:E48.
- Ko, L.J., and J.D. Engel. 1993. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol*. 13:4011-22.
- Koon, H.W., D. Zhao, Y. Zhan, S. Simeonidis, M.P. Moyer, and C. Pothoulakis. 2005. Substance P-stimulated interleukin-8 expression in human colonic epithelial cells involves protein kinase Cdelta activation. *J Pharmacol Exp Ther*. 314:1393-400.
- Krell, R.D., D. Aharony, C.K. Buckner, R.A. Keith, E.J. Kusner, D.W. Snyder, P.R. Bernstein, V.G. Matassa, Y.K. Yee, F.J. Brown, and et al. 1990. The preclinical pharmacology of ICI 204,219. A peptide leukotriene antagonist. *Am Rev Respir Dis*. 141:978-87.
- Kwok, R.P., J.R. Lundblad, J.C. Chrivia, J.P. Richards, H.P. Bachinger, R.G. Brennan, S.G. Roberts, M.R. Green, and R.H. Goodman. 1994. Nuclear protein CBP is a coactivator for the transcription factor CREB. *Nature*. 370:223-6.
- Laberge, S., and S. El Bassam. 2004. Cytokines, structural cells of the lungs and airway inflammation. *Paediatr Respir Rev*. 5 Suppl A:S41-5.

- Laitinen, L.A., A. Laitinen, T. Haahtela, V. Vilkkä, B.W. Spur, and T.H. Lee. 1993. Leukotriene E4 and granulocytic infiltration into asthmatic airways. *Lancet*. 341:989-90.
- Lallena, M.J., M.T. Diaz-Meco, G. Bren, C.V. Paya, and J. Moscat. 1999. Activation of IkappaB kinase beta by protein kinase C isoforms. *Mol Cell Biol*. 19:2180-8.
- Lam, S., H. Chan, J.C. LeRiche, M. Chan-Yeung, and H. Salari. 1988. Release of leukotrienes in patients with bronchial asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 81:711-7.
- Lamoureux, J., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. Leukotriene D4 enhances immunoglobulin production in CD40-activated human B lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*. 117:924-30.
- Lange, P., J. Parner, J. Vestbo, P. Schnohr, and G. Jensen. 1998. A 15-year follow-up study of ventilatory function in adults with asthma. *N Engl J Med*. 339:1194-200.
- Langlois, A., C. Ferland, G.M. Tremblay, and M. Laviolette. 2006. Montelukast regulates eosinophil protease activity through a leukotriene-independent mechanism. *J Allergy Clin Immunol*. 118:113-9.
- Laprise, M.H., F. Grondin, P. Cayer, P.P. McDonald, and C.M. Dubois. 2002. Furin gene (fur) regulation in differentiating human megakaryoblastic Dami cells: involvement of the proximal GATA recognition motif in the P1 promoter and impact on the maturation of furin substrates. *Blood*. 100:3578-87.
- Latvala, J.J., K.E. Reijula, P.S. Clifford, and H.E. Rintamäki. 1995. Cold-induced responses in the upper respiratory tract. *Arctic Med Res*. 54:4-9.
- Laviolette, M., C. Ferland, J.F. Comtois, K. Champagne, M. Bosse, and L.P. Boulet. 1995. Blood eosinophil leukotriene C4 production in asthma of different severities. *Eur Respir J*. 8:1465-72.
- Lazaar, A.L., and R.A. Panettieri, Jr. 2001. Airway smooth muscle as an immunomodulatory cell: a new target for pharmacotherapy? *Curr Opin Pharmacol*. 1:259-64.
- Lazaar, A.L., and R.A. Panettieri, Jr. 2005. Airway smooth muscle: a modulator of airway remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 116:488-95; quiz 496.
- Leckie, M.J., A. ten Brinke, J. Khan, Z. Diamant, B.J. O'Connor, C.M. Walls, A.K. Mathur, H.C. Cowley, K.F. Chung, R. Djukanovic, T.T. Hansel, S.T. Holgate, P.J. Sterk, and P.J. Barnes. 2000. Effects of an interleukin-5 blocking monoclonal antibody on eosinophils, airway hyper-responsiveness, and the late asthmatic response. *Lancet*. 356:2144-8.
- Lee, C.G., H. Link, P. Baluk, R.J. Homer, S. Chapoval, V. Bhandari, M.J. Kang, L. Cohn, Y.K. Kim, D.M. McDonald, and J.A. Elias. 2004a. Vascular endothelial growth factor (VEGF) induces remodeling and enhances TH2-mediated sensitization and inflammation in the lung. *Nat Med*. 10:1095-103.
- Lee, E., T. Robertson, J. Smith, and S. Kilfeather. 2000. Leukotriene receptor antagonists and synthesis inhibitors reverse survival in eosinophils of asthmatic individuals. *Am J Respir Crit Care Med*. 161:1881-6.
- Lee, K.S., S.R. Kim, H.S. Park, G.Y. Jin, and Y.C. Lee. 2004b. Cysteinyl leukotriene receptor antagonist regulates vascular permeability by reducing vascular endothelial growth factor expression. *J Allergy Clin Immunol*. 114:1093-9.
- Leff, A.R. 2001. Regulation of leukotrienes in the management of asthma: biology and clinical therapy. *Annu Rev Med*. 52:1-14.

- Lekstrom-Himes, J., and K.G. Xanthopoulos. 1998. Biological role of the CCAAT/enhancer-binding protein family of transcription factors. *J Biol Chem.* 273:28545-8.
- Lemanske, R.F., Jr. 2000. Inflammatory events in asthma: an expanding equation. *J Allergy Clin Immunol.* 105:S633-6.
- Lemanske, R.F., Jr., and W.W. Busse. 2003. 6. Asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S502-19.
- Lemiere, C., S. Pelissier, C. Tremblay, S. Chaboillez, M. Thivierge, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2004. Leukotrienes and isocyanate-induced asthma: a pilot study. *Clin Exp Allergy.* 34:1684-9.
- Leung, D.Y., and J.W. Bloom. 2003. Update on glucocorticoid action and resistance. *J Allergy Clin Immunol.* 111:3-22; quiz 23.
- Levy, B.D., C. Bonnans, E.S. Silverman, L.J. Palmer, G. Marigowda, and E. Israel. 2005. Diminished lipoxin biosynthesis in severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 172:824-30.
- Lewis, R.A., K.F. Austen, and R.J. Soberman. 1990. Leukotrienes and other products of the 5-lipoxygenase pathway. Biochemistry and relation to pathobiology in human diseases. *N Engl J Med.* 323:645-55.
- Lex, C., A. Zacharasiewicz, D.N. Payne, N.M. Wilson, A.G. Nicholson, S.A. Kharitonov, P.J. Barnes, and A. Bush. 2006. Exhaled breath condensate cysteinyl leukotrienes and airway remodeling in childhood asthma: a pilot study. *Respir Res.* 7:63.
- Lopez, A.D., and C.C. Murray. 1998. The global burden of disease, 1990-2020. *Nat Med.* 4:1241-3.
- Lopez, A.F., C.J. Sanderson, J.R. Gamble, H.D. Campbell, I.G. Young, and M.A. Vadas. 1988. Recombinant human interleukin 5 is a selective activator of human eosinophil function. *J Exp Med.* 167:219-24.
- Lotzer, K., C.D. Funk, and A.J. Habenicht. 2005. The 5-lipoxygenase pathway in arterial wall biology and atherosclerosis. *Biochim Biophys Acta.* 1736:30-7.
- Lotzer, K., R. Spanbroek, M. Hildner, A. Urbach, R. Heller, E. Bretschneider, H. Galczenski, J.F. Evans, and A.J. Habenicht. 2003. Differential leukotriene receptor expression and calcium responses in endothelial cells and macrophages indicate 5-lipoxygenase-dependent circuits of inflammation and atherogenesis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:e32-6.
- Lynch, K.R., G.P. O'Neill, Q. Liu, D.S. Im, N. Sawyer, K.M. Metters, N. Coulombe, M. Abramovitz, D.J. Figueroa, Z. Zeng, B.M. Connolly, C. Bai, C.P. Austin, A. Chateauneuf, R. Stocco, G.M. Greig, S. Kargman, S.B. Hooks, E. Hosfield, D.L. Williams, Jr., A.W. Ford-Hutchinson, C.T. Caskey, and J.F. Evans. 1999. Characterization of the human cysteinyl leukotriene CysLT1 receptor. *Nature.* 399:789-93.
- Mabe, H., H. Nagai, and T. Suzuka. 1990. Role of brain tissue leukotriene in brain oedema following cerebral ischaemia: effect of a 5-lipoxygenase inhibitor, AA-861. *Neurol Res.* 12:165-8.
- Mackay, J.P., K. Kowalski, A.H. Fox, R. Czolij, G.F. King, and M. Crossley. 1998. Involvement of the N-finger in the self-association of GATA-1. *J Biol Chem.* 273:30560-7.

- Maekawa, A., K.F. Austen, and Y. Kanaoka. 2002. Targeted gene disruption reveals the role of cysteinyl leukotriene 1 receptor in the enhanced vascular permeability of mice undergoing acute inflammatory responses. *J Biol Chem.* 277:20820-4.
- Marcus, A.J., M.J. Broekman, L.B. Safier, H.L. Ullman, N. Islam, C.N. Sherhan, L.E. Rutherford, H.M. Korchak, and G. Weissmann. 1982. Formation of leukotrienes and other hydroxy acids during platelet-neutrophil interactions in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 109:130-7.
- Marom, Z., J.H. Shelhamer, M.K. Bach, D.R. Morton, and M. Kaliner. 1982. Slow-reacting substances, leukotrienes C4 and D4, increase the release of mucus from human airways in vitro. *Am Rev Respir Dis.* 126:449-51.
- Massoumi, R., C. Larsson, and A. Sjolander. 2002. Leukotriene D(4) induces stress-fibre formation in intestinal epithelial cells via activation of RhoA and PKCdelta. *J Cell Sci.* 115:3509-15.
- Mastrorade, J.G., M.M. Monick, N. Mukaida, K. Matsushima, and G.W. Hunninghake. 1998. Activator protein-1 is the preferred transcription factor for cooperative interaction with nuclear factor-kappaB in respiratory syncytial virus-induced interleukin-8 gene expression in airway epithelium. *J Infect Dis.* 177:1275-81.
- McGarvey, L.P., K. Dunbar, S.L. Martin, V. Brown, J. Macmahon, M. Ennis, and J.S. Elborn. 2002. Cytokine concentrations and neutrophil elastase activity in bronchoalveolar lavage and induced sputum from patients with cystic fibrosis, mild asthma and healthy volunteers. *J Cyst Fibros.* 1:269-75.
- McGowan, S.E., S.K. Jackson, P.J. Olson, T. Parekh, and L.I. Gold. 1997. Exogenous and endogenous transforming growth factors-beta influence elastin gene expression in cultured lung fibroblasts. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 17:25-35.
- McIntyre, T.M., G.A. Zimmerman, and S.M. Prescott. 1986. Leukotrienes C4 and D4 stimulate human endothelial cells to synthesize platelet-activating factor and bind neutrophils. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83:2204-8.
- McMahon, S., F. Grondin, P.P. McDonald, D.E. Richard, and C.M. Dubois. 2005. Hypoxia-enhanced expression of the proprotein convertase furin is mediated by hypoxia-inducible factor-1: impact on the bioactivation of proproteins. *J Biol Chem.* 280:6561-9.
- McParland, B.E., P.T. Macklem, and P.D. Pare. 2003. Airway wall remodeling: friend or foe? *J Appl Physiol.* 95:426-34.
- Mellor, E.A., K.F. Austen, and J.A. Boyce. 2002. Cysteinyl leukotrienes and uridine diphosphate induce cytokine generation by human mast cells through an interleukin 4-regulated pathway that is inhibited by leukotriene receptor antagonists. *J Exp Med.* 195:583-92.
- Mellor, E.A., N. Frank, D. Soler, M.R. Hodge, J.M. Lora, K.F. Austen, and J.A. Boyce. 2003. Expression of the type 2 receptor for cysteinyl leukotrienes (CysLT2R) by human mast cells: Functional distinction from CysLT1R. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100:11589-93.
- Mellor, E.A., A. Maekawa, K.F. Austen, and J.A. Boyce. 2001. Cysteinyl leukotriene receptor 1 is also a pyrimidinergic receptor and is expressed by human mast cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:7964-9.
- Menard, G., and E.Y. Bissonnette. 2000. Priming of alveolar macrophages by leukotriene D(4): potentiation of inflammation. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 23:572-7.



- Merika, M., and S.H. Orkin. 1993. DNA-binding specificity of GATA family transcription factors. *Mol Cell Biol.* 13:3999-4010.
- Metzger, W.J., G.W. Hunninghake, and H.B. Richerson. 1985. Late asthmatic responses: inquiry into mechanisms and significance. *Clin Rev Allergy.* 3:145-65.
- Mezhybovska, M., K. Wikstrom, J.F. Ohl, and A. Sjolander. 2006. The inflammatory mediator leukotriene D4 induces beta-catenin signaling and its association with antiapoptotic Bcl-2 in intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 281:6776-84.
- Miadonna, A., A. Tedeschi, E. Leggieri, M. Lorini, G. Folco, A. Sala, R. Qualizza, M. Foldi, and C. Zanussi. 1987. Behavior and clinical relevance of histamine and leukotrienes C4 and B4 in grass pollen-induced rhinitis. *Am Rev Respir Dis.* 136:357-62.
- Miller, D.M., Y. Ogawa, K.K. Iwata, P. ten Dijke, A.F. Purchio, M.S. Soloff, and L.E. Gentry. 1992. Characterization of the binding of transforming growth factor-beta 1, -beta 2, and -beta 3 to recombinant beta 1-latency-associated peptide. *Mol Endocrinol.* 6:694-702.
- Minamisawa, H., A. Terashi, Y. Katayama, Y. Kanda, J. Shimizu, T. Shiratori, K. Inamura, H. Kaseki, and Y. Yoshino. 1988. Brain eicosanoid levels in spontaneously hypertensive rats after ischemia with reperfusion: leukotriene C4 as a possible cause of cerebral edema. *Stroke.* 19:372-7.
- Minden, A., A. Lin, T. Smeal, B. Derijard, M. Cobb, R. Davis, and M. Karin. 1994. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol.* 14:6683-8.
- Minoguchi, K., Y. Kohno, H. Minoguchi, N. Kihara, Y. Sano, H. Yasuhara, and M. Adachi. 2002. Reduction of eosinophilic inflammation in the airways of patients with asthma using montelukast. *Chest.* 121:732-8.
- Mita, H., M. Hasegawa, H. Saito, and K. Akiyama. 2001. Levels of cysteinyl leukotriene receptor mRNA in human peripheral leucocytes: significantly higher expression of cysteinyl leukotriene receptor 2 mRNA in eosinophils. *Clin Exp Allergy.* 31:1714-23.
- Miyazono, K., A. Olofsson, P. Colosetti, and C.H. Heldin. 1991. A role of the latent TGF-beta 1-binding protein in the assembly and secretion of TGF-beta 1. *Embo J.* 10:1091-101.
- Molkentin, J.D. 2000. The zinc finger-containing transcription factors GATA-4, -5, and -6. Ubiquitously expressed regulators of tissue-specific gene expression. *J Biol Chem.* 275:38949-52.
- Molloy, S.S., P.A. Bresnahan, S.H. Leppla, K.R. Klimpel, and G. Thomas. 1992. Human furin is a calcium-dependent serine endoprotease that recognizes the sequence Arg-X-X-Arg and efficiently cleaves anthrax toxin protective antigen. *J Biol Chem.* 267:16396-402.
- Mong, S., J. Miller, H.L. Wu, and S.T. Crooke. 1988. Leukotriene D4 receptor-mediated hydrolysis of phosphoinositide and mobilization of calcium in sheep tracheal smooth muscle cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 244:508-15.
- Morrissey, E.E., Z. Tang, K. Sigrist, M.M. Lu, F. Jiang, H.S. Ip, and M.S. Parmacek. 1998. GATA6 regulates HNF4 and is required for differentiation of visceral endoderm in the mouse embryo. *Genes Dev.* 12:3579-90.

- Moskowitz, M.A., K.J. Kiwak, K. Hekimian, and L. Levine. 1984. Synthesis of compounds with properties of leukotrienes C4 and D4 in gerbil brains after ischemia and reperfusion. *Science*. 224:886-9.
- Moss, M.L., S.L. Jin, M.E. Milla, D.M. Bickett, W. Burkhart, H.L. Carter, W.J. Chen, W.C. Clay, J.R. Didsbury, D. Hassler, C.R. Hoffman, T.A. Kost, M.H. Lambert, M.A. Leesnitzer, P. McCauley, G. McGeehan, J. Mitchell, M. Moyer, G. Pahel, W. Rocque, L.K. Overton, F. Schoenen, T. Seaton, J.L. Su, J.D. Becherer, and et al. 1997. Cloning of a disintegrin metalloproteinase that processes precursor tumour-necrosis factor-alpha. *Nature*. 385:733-6.
- Muijsers, R.B., and S. Noble. 2002. Spotlight on montelukast in asthma in children 2 to 14 years of age. *Am J Respir Med*. 1:225-8.
- Mukaida, N., Y. Mahe, and K. Matsushima. 1990. Cooperative interaction of nuclear factor-kappa B- and cis-regulatory enhancer binding protein-like factor binding elements in activating the interleukin-8 gene by pro-inflammatory cytokines. *J Biol Chem*. 265:21128-33.
- Munger, J.S., J.G. Harpel, P.E. Gleizes, R. Mazziere, I. Nunes, and D.B. Rifkin. 1997. Latent transforming growth factor-beta: structural features and mechanisms of activation. *Kidney Int*. 51:1376-82.
- Murayama, T., Y. Ohara, M. Obuchi, K.S. Khabar, H. Higashi, N. Mukaida, and K. Matsushima. 1997. Human cytomegalovirus induces interleukin-8 production by a human monocytic cell line, THP-1, through acting concurrently on AP-1- and NF-kappaB-binding sites of the interleukin-8 gene. *J Virol*. 71:5692-5.
- Nagase, H., and J.F. Woessner, Jr. 1999. Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem*. 274:21491-4.
- Nakayama, K. 1997. Furin: a mammalian subtilisin/Kex2p-like endoprotease involved in processing of a wide variety of precursor proteins. *Biochem J*. 327 ( Pt 3):625-35.
- Neer, E.J. 1995. Heterotrimeric G proteins: organizers of transmembrane signals. *Cell*. 80:249-57.
- Neves, S.R., P.T. Ram, and R. Iyengar. 2002. G protein pathways. *Science*. 296:1636-9.
- Newton, A.C. 1997. Regulation of protein kinase C. *Curr Opin Cell Biol*. 9:161-7.
- Newton, A.C. 2003. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J*. 370:361-71.
- Nielsen, C.K., R. Massoumi, M. Sonnerlind, and A. Sjolander. 2005. Leukotriene D4 activates distinct G-proteins in intestinal epithelial cells to regulate stress fibre formation and to generate intracellular Ca<sup>2+</sup> mobilisation and ERK1/2 activation. *Exp Cell Res*. 302:31-9.
- Nishizuka, Y., and U. Kikkawa. 2003. Early studies of protein kinase C: a historical perspective. *Methods Mol Biol*. 233:9-18.
- Nothacker, H.P., Z. Wang, Y. Zhu, R.K. Reinscheid, S.H. Lin, and O. Civelli. 2000. Molecular cloning and characterization of a second human cysteinyl leukotriene receptor: discovery of a subtype selective agonist. *Mol Pharmacol*. 58:1601-8.
- Nourbakhsh, M., S. Kalble, A. Dorrie, H. Hauser, K. Resch, and M. Kracht. 2001. The NF-kappa b repressing factor is involved in basal repression and interleukin (IL)-1-induced activation of IL-8 transcription by binding to a conserved NF-kappa b-flanking sequence element. *J Biol Chem*. 276:4501-8.

- Noveral, J.P., A. Bhala, R.L. Hintz, M.M. Grunstein, and P. Cohen. 1994. Insulin-like growth factor axis in airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 267:L761-5.
- Obata, T., Y. Okada, M. Motoishi, N. Nakagawa, T. Terawaki, and H. Aishita. 1992. In vitro antagonism of ONO-1078, a newly developed anti-asthma agent, against peptide leukotrienes in isolated guinea pig tissues. *Jpn J Pharmacol.* 60:227-37.
- Ogryzko, V.V., R.L. Schiltz, V. Russanova, B.H. Howard, and Y. Nakatani. 1996. The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell.* 87:953-9.
- Ohtsuki, T., M. Matsumoto, Y. Hayashi, K. Yamamoto, K. Kitagawa, S. Ogawa, S. Yamamoto, and T. Kamada. 1995. Reperfusion induces 5-lipoxygenase translocation and leukotriene C4 production in ischemic brain. *Am J Physiol.* 268:H1249-57.
- Ordenez, C.L., T.E. Shaughnessy, M.A. Matthay, and J.V. Fahy. 2000. Increased neutrophil numbers and IL-8 levels in airway secretions in acute severe asthma: Clinical and biologic significance. *Am J Respir Crit Care Med.* 161:1185-90.
- Orkin, S.H., R.A. Shivdasani, Y. Fujiwara, and M.A. McDevitt. 1998. Transcription factor GATA-1 in megakaryocyte development. *Stem Cells.* 16 Suppl 2:79-83.
- Ottino, P., J. He, T.W. Axelrad, and H.E. Bazan. 2005. PAF-induced furin and MT1-MMP expression is independent of MMP-2 activation in corneal myofibroblasts. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 46:487-96.
- Palombella, V.J., O.J. Rando, A.L. Goldberg, and T. Maniatis. 1994. The ubiquitin-proteasome pathway is required for processing the NF-kappa B1 precursor protein and the activation of NF-kappa B. *Cell.* 78:773-85.
- Panettieri, R.A., E.M. Tan, V. Ciocca, M.A. Luttmann, T.B. Leonard, and D.W. Hay. 1998. Effects of LTD4 on human airway smooth muscle cell proliferation, matrix expression, and contraction In vitro: differential sensitivity to cysteinyl leukotriene receptor antagonists. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 19:453-61.
- Parameswaran, K., G. Cox, K. Radford, L.J. Janssen, R. Sehmi, and P.M. O'Byrne. 2002. Cysteinyl leukotrienes promote human airway smooth muscle migration. *Am J Respir Crit Care Med.* 166:738-42.
- Parameswaran, K., A. Willems-Widyastuti, V.K. Alagappan, K. Radford, A.R. Kranenburg, and H.S. Sharma. 2006. Role of extracellular matrix and its regulators in human airway smooth muscle biology. *Cell Biochem Biophys.* 44:139-46.
- Pare, P.D., C.R. Roberts, T.R. Bai, and B.J. Wiggs. 1997. The functional consequences of airway remodeling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis.* 52:589-96.
- Parhamifar, L., B. Jeppsson, and A. Sjolander. 2005. Activation of cPLA2 is required for leukotriene D4-induced proliferation in colon cancer cells. *Carcinogenesis.* 26:1988-98.
- Paruchuri, S., O. Broom, K. Dib, and A. Sjolander. 2005. The pro-inflammatory mediator leukotriene D4 induces phosphatidylinositol 3-kinase and Rac-dependent migration of intestinal epithelial cells. *J Biol Chem.* 280:13538-44.
- Paruchuri, S., B. Hallberg, M. Juhas, C. Larsson, and A. Sjolander. 2002. Leukotriene D(4) activates MAPK through a Ras-independent but PKCepsilon-dependent pathway in intestinal epithelial cells. *J Cell Sci.* 115:1883-93.

- Pascual, R.M., and S.P. Peters. 2005. Airway remodeling contributes to the progressive loss of lung function in asthma: an overview. *J Allergy Clin Immunol.* 116:477-86; quiz 487.
- Patterson, M.L., S.J. Atkinson, V. Knauper, and G. Murphy. 2001. Specific collagenolysis by gelatinase A, MMP-2, is determined by the hemopexin domain and not the fibronectin-like domain. *FEBS Lett.* 503:158-62.
- Pavord, I.D., R. Ward, G. Woltmann, A.J. Wardlaw, J.R. Sheller, and R. Dworski. 1999. Induced sputum eicosanoid concentrations in asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 160:1905-9.
- Peden, D.B. 1997. Mechanisms of pollution-induced airway disease: in vivo studies. *Allergy.* 52:37-44; discussion 57-8.
- Pedersen, K.E., B.S. Bochner, and B.J. Undem. 1997. Cysteinyl leukotrienes induce P-selectin expression in human endothelial cells via a non-CysLT1 receptor-mediated mechanism. *J Pharmacol Exp Ther.* 281:655-62.
- Penrose, J.F., L. Gagnon, M. Goppelt-Struebe, P. Myers, B.K. Lam, R.M. Jack, K.F. Austen, and R.J. Soberman. 1992. Purification of human leukotriene C4 synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:11603-6.
- Pepe, C., S. Foley, J. Shannon, C. Lemiere, R. Olivenstein, P. Ernst, M.S. Ludwig, J.G. Martin, and Q. Hamid. 2005. Differences in airway remodeling between subjects with severe and moderate asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 116:544-9.
- Perng, D.W., Y.C. Wu, K.T. Chang, M.T. Wu, Y.C. Chiou, K.C. Su, R.P. Perng, and Y.C. Lee. 2006. Leukotriene C4 induces TGF-beta1 production in airway epithelium via p38 kinase pathway. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 34:101-7.
- Pesci, A., M. Majori, A. Cuomo, N. Borciani, S. Bertacco, G. Cacciani, and M. Gabrielli. 1998. Neutrophils infiltrating bronchial epithelium in chronic obstructive pulmonary disease. *Respir Med.* 92:863-70.
- Peters-Golden, M., and A.P. Sampson. 2003. Cysteinyl leukotriene interactions with other mediators and with glucocorticosteroids during airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 111:S37-42; discussion S43-8.
- Piedimonte, G., G. Renzetti, A. Auais, A. Di Marco, S. Tripodi, F. Colistro, A. Villani, V. Di Ciommo, and R. Cutrera. 2005. Leukotriene synthesis during respiratory syncytial virus bronchiolitis: influence of age and atopy. *Pediatr Pulmonol.* 40:285-91.
- Pillai, S.G., D.J. Cousens, A.A. Barnes, P.T. Buckley, M.N. Chiano, L.K. Hosking, L.A. Cameron, M.E. Fling, J.J. Foley, A. Green, H.M. Sarau, D.B. Schmidt, C.S. Sprankle, M.N. Blumenthal, J. Vestbo, K. Kennedy-Wilson, W.E. Wixted, M.J. Wagner, W.H. Anderson, and D.M. Ignar. 2004. A coding polymorphism in the CYSLT2 receptor with reduced affinity to LTD4 is associated with asthma. *Pharmacogenetics.* 14:627-33.
- Pohunek, P., J.O. Warner, J. Turzikova, J. Kudrmann, and W.R. Roche. 2005. Markers of eosinophilic inflammation and tissue re-modelling in children before clinically diagnosed bronchial asthma. *Pediatr Allergy Immunol.* 16:43-51.
- Polito, A.J., and D. Proud. 1998. Epithelia cells as regulators of airway inflammation. *J Allergy Clin Immunol.* 102:714-8.

- Proost, P., A. Wuyts, and J. Van Damme. 1996. Human monocyte chemotactic proteins-2 and -3: structural and functional comparison with MCP-1. *J Leukoc Biol.* 59:67-74.
- Qiu, H., A. Gabrielsen, H.E. Agardh, M. Wan, A. Wetterholm, C.H. Wong, U. Hedin, J. Swedenborg, G.K. Hansson, B. Samuelsson, G. Paulsson-Berne, and J.Z. Haeggstrom. 2006. Expression of 5-lipoxygenase and leukotriene A4 hydrolase in human atherosclerotic lesions correlates with symptoms of plaque instability. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 103:8161-6.
- Rabb, H., Y.M. O'Meara, P. Maderna, P. Coleman, and H.R. Brady. 1997. Leukocytes, cell adhesion molecules and ischemic acute renal failure. *Kidney Int.* 51:1463-8.
- Rabinovitch, N., M. Strand, and E.W. Gelfand. 2006a. Particulate levels are associated with early asthma worsening in children with persistent disease. *Am J Respir Crit Care Med.* 173:1098-105.
- Rabinovitch, N., L. Zhang, and E.W. Gelfand. 2006b. Urine leukotriene E(4) levels are associated with decreased pulmonary function in children with persistent airway obstruction. *J Allergy Clin Immunol.* 118:635-40.
- Radmark, O., T. Shimizu, H. Jornvall, and B. Samuelsson. 1984. Leukotriene A4 hydrolase in human leukocytes. Purification and properties. *J Biol Chem.* 259:12339-45.
- Rajah, R., R.V. Nachajon, M.H. Collins, H. Hakonarson, M.M. Grunstein, and P. Cohen. 1999. Elevated levels of the IGF-binding protein protease MMP-1 in asthmatic airway smooth muscle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 20:199-208.
- Ray, A., and L. Cohn. 1999. Th2 cells and GATA-3 in asthma: new insights into the regulation of airway inflammation. *J Clin Invest.* 104:985-93.
- Redington, A.E., J. Madden, A.J. Frew, R. Djukanovic, W.R. Roche, S.T. Holgate, and P.H. Howarth. 1997. Transforming growth factor-beta 1 in asthma. Measurement in bronchoalveolar lavage fluid. *Am J Respir Crit Care Med.* 156:642-7.
- Reiter, R.J., D. Acuna-Castroviejo, D.X. Tan, and S. Burkhardt. 2001. Free radical-mediated molecular damage. Mechanisms for the protective actions of melatonin in the central nervous system. *Ann N Y Acad Sci.* 939:200-15.
- Roebroek, A.J., J.A. Schalken, M.J. Bussemakers, H. van Heerikhuizen, C. Onnekink, F.M. Debruyne, H.P. Bloemers, and W.J. Van de Ven. 1986. Characterization of human c-fes/fps reveals a new transcription unit (fur) in the immediately upstream region of the proto-oncogene. *Mol Biol Rep.* 11:117-25.
- Romano, M., and J. Claria. 2003. Cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase converging functions on cell proliferation and tumor angiogenesis: implications for cancer therapy. *Faseb J.* 17:1986-95.
- Ryck, A., L. De Kimpe, S. Mikhalap, T. Vantus, T. Seufferlein, J.R. Vandenheede, and J. Van Lint. 2003. Protein kinase D: a family affair. *FEBS Lett.* 546:81-6.
- Sala, A., G.M. Aliev, G. Rossoni, F. Berti, C. Buccellati, G. Burnstock, G. Folco, and J. Maclof. 1996. Morphological and functional changes of coronary vasculature caused by transcellular biosynthesis of sulfidopeptide leukotrienes in isolated heart of rabbit. *Blood.* 87:1824-32.
- Sala, A., G. Rossoni, F. Berti, C. Buccellati, A. Bonazzi, J. Maclof, and G. Folco. 2000. Monoclonal anti-CD18 antibody prevents transcellular biosynthesis of cysteinyl leukotrienes in vitro and in vivo and protects against leukotriene-dependent

- increase in coronary vascular resistance and myocardial stiffness. *Circulation*. 101:1436-40.
- Sala, A., G. Rossoni, C. Buccellati, F. Berti, G. Folco, and J. MacLouf. 1993. Formation of sulphidopeptide-leukotrienes by cell-cell interaction causes coronary vasoconstriction in isolated, cell-perfused heart of rabbit. *Br J Pharmacol*. 110:1206-12.
- Sala, A., N. Voelkel, J. MacLouf, and R.C. Murphy. 1990. Leukotriene E4 elimination and metabolism in normal human subjects. *J Biol Chem*. 265:21771-8.
- Sampson, A.P. 1996. The leukotrienes: mediators of chronic inflammation in asthma. *Clin Exp Allergy*. 26:995-1004.
- Sampson, A.P., E. Pizzichini, and H. Bisgaard. 2003. Effects of cysteinyl leukotrienes and leukotriene receptor antagonists on markers of inflammation. *J Allergy Clin Immunol*. 111:S49-59; discussion S59-61.
- Samuelsson, B. 1983. Leukotrienes: mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*. 220:568-75.
- Samuelsson, B. 2000. The discovery of the leukotrienes. *Am J Respir Crit Care Med*. 161:S2-6.
- Samuelsson, B., S.E. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer, and C.N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. *Science*. 237:1171-6.
- Sarau, H.M., R.S. Ames, J. Chambers, C. Ellis, N. Elshourbagy, J.J. Foley, D.B. Schmidt, R.M. Muccitelli, O. Jenkins, P.R. Murdock, N.C. Herrity, W. Halsey, G. Sathe, A.I. Muir, P. Nuthulaganti, G.M. Dytko, P.T. Buckley, S. Wilson, D.J. Bergsma, and D.W. Hay. 1999. Identification, molecular cloning, expression, and characterization of a cysteinyl leukotriene receptor. *Mol Pharmacol*. 56:657-63.
- Schaller, M., C.M. Hogaboam, N. Lukacs, and S.L. Kunkel. 2006. Respiratory viral infections drive chemokine expression and exacerbate the asthmatic response. *J Allergy Clin Immunol*. 118:295-302; quiz 303-4.
- Schmitt-Grohe, S., and S. Zielen. 2005. Leukotriene receptor antagonists in children with cystic fibrosis lung disease : anti-inflammatory and clinical effects. *Paediatr Drugs*. 7:353-63.
- Seidah, N.G., and M. Chretien. 1997. Eukaryotic protein processing: endoproteolysis of precursor proteins. *Curr Opin Biotechnol*. 8:602-7.
- Sener, G., L. Kabasakal, S. Cetinel, G. Contuk, N. Gedik, and B.C. Yegen. 2005a. Leukotriene receptor blocker montelukast protects against burn-induced oxidative injury of the skin and remote organs. *Burns*. 31:587-96.
- Sener, G., O. Sehirli, S. Cetinel, F. Ercan, M. Yuksel, N. Gedik, and B.C. Yegen. 2005b. Amelioration of sepsis-induced hepatic and ileal injury in rats by the leukotriene receptor blocker montelukast. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*. 73:453-62.
- Sener, G., O. Sehirli, A. Velioglu-Ogunc, S. Cetinel, N. Gedik, M. Caner, A. Sakarcin, and B.C. Yegen. 2006. Montelukast protects against renal ischemia/reperfusion injury in rats. *Pharmacol Res*. 54:65-71.
- Senftleben, U., and M. Karin. 2002. The IKK/NF-kappaB pathway. *Crit Care Med*. 30:S18-S26.

- Shapiro, J., N. Sciaky, J. Lee, H. Bosshart, R.H. Angeletti, and J.S. Bonifacino. 1997. Localization of endogenous furin in cultured cell lines. *J Histochem Cytochem.* 45:3-12.
- Shaw-White, J.R., M.D. Bruno, and J.A. Whitsett. 1999. GATA-6 activates transcription of thyroid transcription factor-1. *J Biol Chem.* 274:2658-64.
- Shepherd, G.L., M.R. Hetzel, and T.J. Clark. 1981. Regular versus symptomatic aerosol bronchodilator treatment of asthma. *Br J Dis Chest.* 75:215-7.
- Shimizu, R., and M. Yamamoto. 2005. Gene expression regulation and domain function of hematopoietic GATA factors. *Semin Cell Dev Biol.* 16:129-36.
- Shofuda, K., K. Moriyama, A. Nishihashi, S. Higashi, H. Mizushima, H. Yasumitsu, K. Miki, H. Sato, M. Seiki, and K. Miyazaki. 1998. Role of tissue inhibitor of metalloproteinases-2 (TIMP-2) in regulation of pro-gelatinase A activation catalyzed by membrane-type matrix metalloproteinase-1 (MT1-MMP) in human cancer cells. *J Biochem (Tokyo).* 124:462-70.
- Sjostrom, M., A.S. Johansson, O. Schroder, H. Qiu, J. Palmblad, and J.Z. Haeggstrom. 2003. Dominant expression of the CysLT2 receptor accounts for calcium signaling by cysteinyl leukotrienes in human umbilical vein endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 23:e37-41.
- Smith, L.J., S. Geller, L. Ebright, M. Glass, and P.T. Thyrum. 1990. Inhibition of leukotriene D4-induced bronchoconstriction in normal subjects by the oral LTD4 receptor antagonist ICI 204,219. *Am Rev Respir Dis.* 141:988-92.
- Sounni, N.E., M. Janssen, J.M. Foidart, and A. Noel. 2003. Membrane type-1 matrix metalloproteinase and TIMP-2 in tumor angiogenesis. *Matrix Biol.* 22:55-61.
- Sousa, A.R., S.J. Lane, J.A. Nakhosteen, T. Yoshimura, T.H. Lee, and R.N. Poston. 1994. Increased expression of the monocyte chemoattractant protein-1 in bronchial tissue from asthmatic subjects. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 10:142-7.
- Spencer, D.A., A.P. Sampson, C.P. Green, J.F. Costello, P.J. Piper, and J.F. Price. 1992. Sputum cysteinyl-leukotriene levels correlate with the severity of pulmonary disease in children with cystic fibrosis. *Pediatr Pulmonol.* 12:90-4.
- Spitaler, M., and D.A. Cantrell. 2004. Protein kinase C and beyond. *Nat Immunol.* 5:785-90.
- Steiner, D.F. 1998. The proprotein convertases. *Curr Opin Chem Biol.* 2:31-9.
- Storms, W., and M.A. Kaliner. 2005. Cromolyn sodium: fitting an old friend into current asthma treatment. *J Asthma.* 42:79-89.
- Storms, W.W. 2005. Asthma associated with exercise. *Immunol Allergy Clin North Am.* 25:31-43.
- Streit, M., and M. Detmar. 2003. Angiogenesis, lymphangiogenesis, and melanoma metastasis. *Oncogene.* 22:3172-9.
- Sutherland, E.R., and R.J. Martin. 2003. Airway inflammation in chronic obstructive pulmonary disease: comparisons with asthma. *J Allergy Clin Immunol.* 112:819-27; quiz 828.
- Takasaki, J., M. Kamohara, M. Matsumoto, T. Saito, T. Sugimoto, T. Ohishi, H. Ishii, T. Ota, T. Nishikawa, Y. Kawai, Y. Masuho, T. Isogai, Y. Suzuki, S. Sugano, and K. Furuichi. 2000. The molecular characterization and tissue distribution of the human cysteinyl leukotriene CysLT(2) receptor. *Biochem Biophys Res Commun.* 274:316-22.

- Taniguchi, N., H. Mita, H. Saito, Y. Yui, T. Kajita, and T. Shida. 1985. Increased generation of leukotriene C4 from eosinophils in asthmatic patients. *Allergy*. 40:571-3.
- Thivierge, M., M. Doty, J. Johnson, J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2000. IL-5 up-regulates cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in HL-60 cells differentiated into eosinophils. *J Immunol*. 165:5221-6.
- Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2001. IL-13 and IL-4 up-regulate cysteinyl leukotriene 1 receptor expression in human monocytes and macrophages. *J Immunol*. 167:2855-60.
- Thivierge, M., J. Stankova, and M. Rola-Pleszczynski. 2006. Toll-like receptor agonists differentially regulate cysteinyl-leukotriene receptor 1 expression and function in human dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 117:1155-62.
- Thodeti, C.K., C.K. Nielsen, S. Paruchuri, C. Larsson, and A. Sjolander. 2001. The epsilon isoform of protein kinase C is involved in regulation of the LTD(4)-induced calcium signal in human intestinal epithelial cells. *Exp Cell Res*. 262:95-103.
- Thomas, G. 2002. Furin at the cutting edge: from protein traffic to embryogenesis and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 3:753-66.
- Thompson, M.D., K. Storm van's Gravesande, H. Galczynski, W.M. Burnham, K.A. Siminovitch, N. Zamel, A. Slutsky, J.M. Drazen, S.R. George, J.F. Evans, and B.F. O'Dowd. 2003. A cysteinyl leukotriene 2 receptor variant is associated with atopy in the population of Tristan da Cunha. *Pharmacogenetics*. 13:641-9.
- Thurston, G., J.S. Rudge, E. Ioffe, H. Zhou, L. Ross, S.D. Croll, N. Glazer, J. Holash, D.M. McDonald, and G.D. Yancopoulos. 2000. Angiopoietin-1 protects the adult vasculature against plasma leakage. *Nat Med*. 6:460-3.
- Tillie-Leblond, I., P. Gosset, and A.B. Tonnel. 2005. Inflammatory events in severe acute asthma. *Allergy*. 60:23-9.
- Tomari, S., H. Matsuse, I. Machida, Y. Kondo, T. Kawano, Y. Obase, C. Fukushima, T. Shimoda, and S. Kohno. 2003. Pranlukast, a cysteinyl leukotriene receptor 1 antagonist, attenuates allergen-specific tumour necrosis factor alpha production and nuclear factor kappa B nuclear translocation in peripheral blood monocytes from atopic asthmatics. *Clin Exp Allergy*. 33:795-801.
- Traenckner, E.B., H.L. Pahl, T. Henkel, K.N. Schmidt, S. Wilk, and P.A. Baeuerle. 1995. Phosphorylation of human I kappa B-alpha on serines 32 and 36 controls I kappa B-alpha proteolysis and NF-kappa B activation in response to diverse stimuli. *Embo J*. 14:2876-83.
- Turner, M.O., P. Hussack, M.R. Sears, J. Dolovich, and F.E. Hargreave. 1995. Exacerbations of asthma without sputum eosinophilia. *Thorax*. 50:1057-61.
- Underwood, D.C., R.R. Osborn, S.J. Newsholme, T.J. Torphy, and D.W. Hay. 1996. Persistent airway eosinophilia after leukotriene (LT) D4 administration in the guinea pig: modulation by the LTD4 receptor antagonist, pranlukast, or an interleukin-5 monoclonal antibody. *Am J Respir Crit Care Med*. 154:850-7.
- Uzonyi, B., K. Lotzer, S. Jahn, C. Kramer, M. Hildner, E. Bretschneider, D. Radke, M. Beer, R. Vollandt, J.F. Evans, C.D. Funk, and A.J. Habenicht. 2006. Cysteinyl leukotriene 2 receptor and protease-activated receptor 1 activate strongly



- correlated early genes in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:6326-31.
- Van Eerdewegh, P., R.D. Little, J. Dupuis, R.G. Del Mastro, K. Falls, J. Simon, D. Torrey, S. Pandit, J. McKenny, K. Braunschweiger, A. Walsh, Z. Liu, B. Hayward, C. Folz, S.P. Manning, A. Bawa, L. Saracino, M. Thackston, Y. Benchekroun, N. Capparell, M. Wang, R. Adair, Y. Feng, J. Dubois, M.G. FitzGerald, H. Huang, R. Gibson, K.M. Allen, A. Pedan, M.R. Danzig, S.P. Umland, R.W. Egan, F.M. Cuss, S. Rorke, J.B. Clough, J.W. Holloway, S.T. Holgate, and T.P. Keith. 2002. Association of the ADAM33 gene with asthma and bronchial hyperresponsiveness. *Nature*. 418:426-30.
- van Schaik, S.M., D.A. Tristram, I.S. Nagpal, K.M. Hintz, R.C. Welliver, 2nd, and R.C. Welliver. 1999. Increased production of IFN-gamma and cysteinyl leukotrienes in virus-induced wheezing. *J Allergy Clin Immunol*. 103:630-6.
- Volovitz, B., R.C. Welliver, G. De Castro, D.A. Krystofik, and P.L. Ogra. 1988. The release of leukotrienes in the respiratory tract during infection with respiratory syncytial virus: role in obstructive airway disease. *Pediatr Res*. 24:504-7.
- Waldron, R.T., and E. Rozengurt. 2003. Protein kinase C phosphorylates protein kinase D activation loop Ser744 and Ser748 and releases autoinhibition by the pleckstrin homology domain. *J Biol Chem*. 278:154-63.
- Wardlaw, A.J., R. Moqbel, and A.B. Kay. 1995. Eosinophils: biology and role in disease. *Adv Immunol*. 60:151-266.
- Wark, P.A., S.L. Johnston, I. Moric, J.L. Simpson, M.J. Hensley, and P.G. Gibson. 2002. Neutrophil degranulation and cell lysis is associated with clinical severity in virus-induced asthma. *Eur Respir J*. 19:68-75.
- Weisberg, S.C. 2000. Pharmacotherapy of asthma in children, with special reference to leukotriene receptor antagonists. *Pediatr Pulmonol*. 29:46-61.
- Wen, X., and G.D. Wu. 2001. Evidence for epigenetic mechanisms that silence both basal and immune-stimulated transcription of the IL-8 gene. *J Immunol*. 166:7290-9.
- Weyrich, A.S., T.M. McIntyre, R.P. McEver, S.M. Prescott, and G.A. Zimmerman. 1995. Monocyte tethering by P-selectin regulates monocyte chemotactic protein-1 and tumor necrosis factor-alpha secretion. Signal integration and NF-kappa B translocation. *J Clin Invest*. 95:2297-303.
- Wikstrom, K., M. Juhas, and A. Sjolander. 2003. The anti-apoptotic effect of leukotriene D4 involves the prevention of caspase 8 activation and Bid cleavage. *Biochem J*. 371:115-24.
- Wills-Karp, M. 2001. IL-12/IL-13 axis in allergic asthma. *J Allergy Clin Immunol*. 107:9-18.
- Wills-Karp, M., J. Luyimbazi, X. Xu, B. Schofield, T.Y. Neben, C.L. Karp, and D.D. Donaldson. 1998. Interleukin-13: central mediator of allergic asthma. *Science*. 282:2258-61.
- Wilson, J.W., and S. Hii. 2006. The importance of the airway microvasculature in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*. 6:51-5.
- Winterbourn, C.C., M.C. Vissers, and A.J. Kettle. 2000. Myeloperoxidase. *Curr Opin Hematol*. 7:53-8.
- Winzen, R., M. Kracht, B. Ritter, A. Wilhelm, C.Y. Chen, A.B. Shyu, M. Muller, M. Gaestel, K. Resch, and H. Holtmann. 1999. The p38 MAP kinase pathway signals

- for cytokine-induced mRNA stabilization via MAP kinase-activated protein kinase 2 and an AU-rich region-targeted mechanism. *Embo J.* 18:4969-80.
- Woszczek, G., R. Pawliczak, H.Y. Qi, S. Nagineni, S. Alsaaty, C. Logun, and J.H. Shelhamer. 2005. Functional characterization of human cysteinyl leukotriene 1 receptor gene structure. *J Immunol.* 175:5152-9.
- Wu, G.D., E.J. Lai, N. Huang, and X. Wen. 1997. Oct-1 and CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) bind to overlapping elements within the interleukin-8 promoter. The role of Oct-1 as a transcriptional repressor. *J Biol Chem.* 272:2396-403.
- Yana, I., and S.J. Weiss. 2000. Regulation of membrane type-1 matrix metalloproteinase activation by proprotein convertases. *Mol Biol Cell.* 11:2387-401.
- Yu, Q., and I. Stamenkovic. 2000. Cell surface-localized matrix metalloproteinase-9 proteolytically activates TGF-beta and promotes tumor invasion and angiogenesis. *Genes Dev.* 14:163-76.
- Zhang, Y., X. Feng, R. We, and R. Derynck. 1996. Receptor-associated Mad homologues synergize as effectors of the TGF-beta response. *Nature.* 383:168-72.
- Zhao, L., M.P. Moos, R. Grabner, F. Pedrono, J. Fan, B. Kaiser, N. John, S. Schmidt, R. Spanbroek, K. Lotzer, L. Huang, J. Cui, D.J. Rader, J.F. Evans, A.J. Habenicht, and C.D. Funk. 2004. The 5-lipoxygenase pathway promotes pathogenesis of hyperlipidemia-dependent aortic aneurysm. *Nat Med.* 10:966-73.
- Zhu, Z., R.J. Homer, Z. Wang, Q. Chen, G.P. Geba, J. Wang, Y. Zhang, and J.A. Elias. 1999. Pulmonary expression of interleukin-13 causes inflammation, mucus hypersecretion, subepithelial fibrosis, physiologic abnormalities, and eotaxin production. *J Clin Invest.* 103:779-88.
- Zimmermann, N., G.K. Hershey, P.S. Foster, and M.E. Rothenberg. 2003. Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13. *J Allergy Clin Immunol.* 111:227-42; quiz 243.
- Zingarelli, B., M. Sheehan, and H.R. Wong. 2003. Nuclear factor-kappaB as a therapeutic target in critical care medicine. *Crit Care Med.* 31:S105-11.